

**DIE ENTWICKLUNG DES EMBRYOS
DER JAPANISCHEN WACHTEL
UNTER IN VITRO- BEDINGUNGEN**

Herbert Kaltner

Disbui. München

1989

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

**DIE ENTWICKLUNG DES EMBRYOS DER JAPANISCHEN WACHTEL UNTER IN
VITRO- BEDINGUNGEN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Herbert Kaltner
aus
Dachau

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Univ.- Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. Dr. habil. J. Wittmann
Korreferent: Univ.- Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
1. Embryonalentwicklung beim Vogel	1
2. Embryonale Ernährung	5
3. Embryonale Entwicklung und Nukleinsäurensynthese	12
4. Ausscheidungsprodukte des Protein- und Nukleinsäurenstoffwechsels	14
5. Methoden zur Kultivierung des Geflügelembryos	15
6. Zielsetzung	19
II. Material und Methoden	20
1. Material	20
2. Methoden	21
2.1. Kultivierung der Embryonen	21
2.3. Analytische Methoden	22
2.3.1. Probennahme, Probenkonservierung und Applikation von Substanzen	22
2.3.2. Messung der O ₂ - und CO ₂ -Konzentration	22
2.3.3. Volumenbestimmungen	23
2.3.4. Bestimmung von D- Glucose	24
2.3.5. Bestimmung von L- Laktat	24
2.3.6. Messung und Meßgrößen des ⁴² K ⁺ - Transports	24
2.3.7. Analyse der freien Aminosäuren	25
2.3.8. Bestimmung des Einbaus von 6[- ³ H]Thymidin in die Kern- DNS	27
2.3.9. Bestimmung der Proteinsynthese mit L[-U- ¹⁴ C]Glutaminsäure	28
2.3.10. Harnsäurebestimmung	30
2.3.11. Bestimmung von Nukleosiden in der Allantoisflüssigkeit	30
2.3.11.1. Probenaufbereitung	30
2.3.11.2. Reinigung mit Hilfe eines borsäuresubstituierten Affinitätschromatographiegels	30
2.3.11.3. Auftrennung mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	31
2.4. Statistische Auswertung	34
III. Ergebnisse	37
A. Entwicklung der Kultivierungsmethode	37
B. Bildung und Zusammensetzung der subembryonalen Flüssigkeit	41
1. Flüssigkeitstransfer zwischen Eiklar und subembryonalem Kompartiment	41
2. Transport von D- Glucose und ⁴² K ⁺	46
2.1. D- Glucose im Eiklar und in der subembryonalen Flüssigkeit	47
2.2. L- Laktat in der subembryonalen Flüssigkeit	50
2.3. Transfer von ⁴² K ⁺ aus dem Eiklar in die subembryonale Flüssigkeit	53

C. Embryonales Wachstum	56
1. Darstellung der embryonalen Gewichtsentwicklung unter Berücksichtigung des DNS- und Proteingehaltes	56
2. Markierung der Kern- DNS mit 6[- ³ H]Thymidin	61
3. Einbau von L- Glutaminsäure in das embryonale Protein	62
D. Ausscheidung in die Allantoisflüssigkeit	69
IV. Diskussion	75
1. Kultivierung: Induktion der Embryogenese	75
2. Der Einfluß der Kultivierung und des Wendens auf die Bildung und Zusammensetzung der subembryonalen Flüssigkeit	77
3. Embryonales Wachstum	83
4. Ausscheidung von Harnsäure, Nukleosiden und methylierten Nukleosiden in die Allantois	86
V. Zusammenfassung	87
Summary	
VI. Literaturverzeichnis	91

EINLEITUNG

1. Embryonalentwicklung beim Vogel

Bereits vor Ablage des Eies kommt es intrauterin zu verschiedenen Gestaltungsvorgängen in der Keimscheibe. EYAL-GILADI und KOCHAV (1976 und 1980) unterscheiden mehrere Entwicklungsstadien vor dem Legen des Eies. Während des sog. "Cleavage" (Entwicklungsstadium I-VI E.G. & K.¹) wird das Cytoplasma der Keimscheibe in Furchungszellen (Blastomere) unterteilt. Die subblastodermale Höhle bildet sich zwischen Keim und Dottermasse als enger Spalt aus. In den Zellen sind Glykogen und Dotterpartikel gespeichert. Die Bildung der Area pellucida (Entwicklungsstadien VII-X E.G. & K.) ist der nächste Entwicklungsschritt. Dabei runden sich die subepithelialen Zellen ab und fallen in den subblastodermalen Raum. Das Epithel des Blastoderms ist am Ende dieses Vorgangs einschichtig. Die abgelösten Zellen sammeln sich an der anterioren Seite des Blastoderms. In diesem Entwicklungsstatus wird das Ei i.d.R. gelegt. Der Keim hat zu diesem Zeitpunkt einen Durchmesser von 3,5 mm und besteht etwa aus 60000 Zellen (Embryo und extraembryonale Hüllen). Wenn die letzten dotterbeladenen Zellen sich abgeschieden haben, kommt es zur Polyinvagination hypoblastischer Zellen. Die Bildung des Hypoblasten (Entwicklungsstadien XI-XIII E.G. & K.), die in den ersten 4 Inkubationsstunden stattfindet, geschieht vor Ausbildung des Primitivstreifens und leitet in die zweite Phase über, die Phase der Embryogenese.

Das Blastoderm ist durch die transparente zentrale Area pellucida und die periphere Area opaka charakterisiert. Das Blastoderm breitet sich mit seinem peripheren Umwachsungsrand über die Dottermassen (Area vitellina) aus. Die beiden primären Keimblätter (Ekto - und Endoderm) beginnen die Dottermassen zu umwachsen. Nach 6 - 7 Inkubationsstunden wird der mediane Primitivstreifen gebildet, dessen Vorderende zum

¹ Entwicklungsstufen nach EYAL-GILADI und KOCHAV

Primitivknoten (Hensenscher Knoten) verdickt ist. Vor dem Primitivstreifen liegt der Kopffortsatz, die Anlage der Chorda dorsalis. Die Neuralwülste als Anlagen des ZNS bilden sich im Abschnitt vor dem Primitivstreifen.

In diesen ersten Inkubationsstunden kommt es zu einer Reihe morphogenetischer Bewegungen. Nach WADDINGTON (1933), SPRATT und HAAS (1960a,b) setzen nach ca. 5 Inkubationsstunden von einem exzentrisch am Hinterrand der Area pellucida gelegenen Zentrum ausgehend Gestaltungsvorgänge ein. Die Zellbewegungen bilden eine bilateral symmetrische Figur und reichen bis in die Randzone der Area pellucida, von der aus wieder ein Rückstrom der Zellen in das Zentrum stattfindet. Bei Explantaten, in denen z.B. eine Hälfte der Area pellucida blockiert wurde, verliefen die Zellströme nicht asymmetrisch. Eine Blockade dieser Bewegungen führte zur Hemmung der Embryonalentwicklung. Zellbewegungen im Bereich des Ektoblasten setzen ca. 8 Stunden später ein. Dabei sammelt sich über dem Zentrum des Endoblasten Zellmaterial an, das sich in Richtung des Primitivstreifens bewegt und zur Streckung des Streifens führt. Mit der Verlängerung des Primitivstreifens tritt die Zellströmung in den Hintergrund. Die endodermale Schicht bestimmt die Orientierung des Streifens und der Organe in der Achsenebene des Embryos.

Im Ektoblasten wird Zellmaterial im Bereich des Primitivstreifens in die Tiefe verlagert und nach der Seite hin verschoben. Dadurch entsteht das Mesoderm, aus dessen Stamplatte sich die segmental angeordneten Somiten entwickeln. Im Seitenplattenbereich tritt intra- und extra-embryonal der Coelomspalt auf.

Den Gestaltungsvorgängen liegt die sogenannte Induktion zugrunde. Darunter versteht man Effekte, die von einem embryonalen Gewebe (dem Induktor) auf ein anderes übertragen werden, so daß sich dessen Entwicklungsrichtung qualitativ verändert. Das "Entoblasten- Zentrum" stellt einen sog. primären Induktor dar. Der Primitivknoten bildet zu einem späteren Zeitpunkt ein weiteres Induktionszentrum, von dem aus die Bildung der Chorda, der Somiten und die Induktion der Neuralanlage erfolgt.

Zu Beginn des zweiten Bebrütungstages sind an der Medullaranlage Hirnbläschen und Rückenmark unterscheidbar. Die Einschnürungen zwischen den Hirnregionen werden in den nächsten Entwicklungstagen tiefer, das Mesenzephalon ist der dabei am deutlichsten ausgeprägte Abschnitt.

Eine Übersicht über die weiteren Entwicklungsschritte gibt die Darstellung von HAMBURGER und HAMILTON (1951) für den Hühnerembryo. PADGETT und IVEY (1960) haben diese "Hamburger - Hamilton - Stages" für den Wachtelembryo modifiziert. Diese Einteilungen beziehen sich auf die Struktur - und Formbildung der äußeren Körperpartien, um den jeweiligen Entwicklungsstatus zu kennzeichnen. Die gesamte Embryonalentwicklung wird in 44 Entwicklungsstufen eingeteilt. Als wesentliche Kriterien werden die Zahl der Somiten, die Krümmungen und Drehungen des Embryos, die Ausbildung der Gliedmaßen, die Gestaltungsvorgänge im Bereich der Kiemenbögen und das Auftreten von Federpapillen und der Befiederung hervorgehoben.

Die Entwicklung der Blutgefäße in den extraembryonalen Membranen ist neben dem Wachstum des Embryos ein wichtiges Merkmal, um den Erfolg einer Kultivierung zu überprüfen. Als erste Anlagen bilden sich sog. "Blutinseln". Die Zellen stammen aus dem Gebiet des Primitivstreifens und wandern in das viszerale Blatt des Mesoblasten ein. Am zweiten Bebrütungstag wird Hämoglobin gebildet, und die "Blutinseln" sind als rote Flecke sichtbar. Der Sinus terminalis, der die Area vasculosa begrenzt, ist die nächste sichtbare Struktur. Von diesem Randsinus aus wachsen die Gefäße in der Medianen auf den Embryonalkörper zu und schließen an das kaudale Ende des Herzschlauches an. Die Blutströmung wird in diesem Stadium als wichtigster morphogenetischer Faktor wirksam. Der primäre Dottersackkreislauf besteht aus den Aa. omphalomesentericae, die kaudal der gleichnamigen Venen aus der Aorta entspringen. Die rechte vordere Vene und der Randsinus bilden sich schließlich zurück. Im sekundären Dottersackkreislauf sind die V. omphalomesenterica posterior und sekundär angelegte Venen vorhanden, die die Aa. omphalomesentericae



begleiten. Nach ca. 65 Inkubationsstunden beginnt sich die Allantois als Ausstülpung des Enddarms zu entwickeln. Die Aa. allantoideae entspringen aus dem Kaudalende der Aorta. Die Vv. umbilicales sind paarig angelegt, die rechte bildet sich später zurück. Die Membranen der Allantois und des Chorions wachsen nach entsprechender Größenzunahme der Allantois zur Chorioallantoismembran (CAM) zusammen.

2. Embryonale Ernährung

Der Dotter versorgt in der ersten Hälfte der Embryonalentwicklung den Vogelembryo mit Protein und Lipiden. Das Eiklar trägt in dieser Periode durch Abgabe von Flüssigkeit und niedermolekularen Substanzen (z.B. D-Glucose) zur Ernährung des Embryos bei. Das Eiklar nimmt an Bedeutung zu, wenn in der zweiten Hälfte der Inkubation Eiklar über die sero-amniotische Verbindung in die Amnionflüssigkeit aufgenommen wird und vom Embryo abgeschluckt wird. Den restlichen Dotter, in den über den Dottersacknabel noch etwa 30 % des Eiklars aufgenommen wird (MC INDOE 1960), zieht das Küken kurz vor dem Schlupf in die Bauchhöhle ein. Dieser Restdotter dient dem Küken für 2 - 3 Tage postnatal als Nahrungsreserve.

Nach BELLAIRS (1960) und WILLIAMS (1967) wird die Absorption von Dotterbestandteilen in drei Phasen eingeteilt. In der ersten Phase dienen Dottereinschlüsse in den Furchungszellen, die in der Area pellucida bis zur Bildung des Primitivstreifens bestehen bleiben, als Nahrungsquelle. Die zweite Phase betrifft die in den Endodermzellen der Area opaka eingeschlossenen Dotterpartikel. Es handelt sich dabei um Dotterbestandteile, die mittels Phagozytose aufgenommen werden und dem intrazellulären Abbau unterliegen. Über das sich am zweiten Inkubationstag bildende Blutgefäßsystem werden die Abbauprodukte dem Embryo zugeführt. An diese Periode schließt der extrazelluläre Abbau des Dotters an. Vom Dottersackendoderm werden proteolytische Enzyme sezerniert, deren Aktivität nach 3 Bebrütungstagen gemessen werden kann. Dabei kommt es im Dotter zu einem unterschiedlichen Anstieg der einzelnen Aminosäuren (WILLIAMS et al. 1954; TAUSSIG 1965).

In der Aktivität dieser proteolytischen Enzyme vermutete WILLIAMS (1967) eine wichtige Ursache der Verflüssigung des Dotters und der Entstehung der subembryonalen Flüssigkeit. Bereits 1956 hatte NEW beobachtet, daß sich in der ersten Bebrütungswoche Flüssigkeit unter dem Embryo ansammelt. In einem Experiment mit einem Blastodermexplantat konnte er die

Bildung der subembryonalen Flüssigkeit nachvollziehen. Nach 24 - 48 Stunden Inkubationsdauer in ovo wurde das Blastoderm explantiert und für zwei bis drei Tage auf Eiklar in Kultur gehalten. In den Fällen, in denen das Endoderm nach unten lag, sammelte sich über dem Blastoderm Flüssigkeit an. In den Versuchen, in denen das Ektoderm nach unten zu liegen kam, rollten sich die Enden des Explantats nach innen ein und waren damit wieder in Verbindung mit der Dottermembran, die zwischen Eiklar und Explantat gespannt war. Ein flüssigkeitsgefülltes Bläschen war oft das Resultat dieses Vorgangs. NEW folgerte aus diesen Befunden, daß das Ektoderm Flüssigkeit absorbiert und das Endoderm Flüssigkeit in den subembryonalen Raum sezerniert. Dotter und Eiklar tragen zur Bildung der subembryonalen Flüssigkeit bei, wobei das Wasser aus dem Eiklar kommt.

Beim Hühnerembryo liegt die Flüssigkeit in einem Zeitraum zwischen Tag 2 mit 0,64 ml und Tag 15 mit 0,10 ml vor. Einen Höchstwert erreicht die Flüssigkeit am Tag 7 mit 13,61 ml (ROMANOFF 1967). Die subembryonale Flüssigkeit bildet die eigentliche physiologische Umgebung für die normale Entwicklung des Embryos. Die Na^+ -, K^+ - und Cl^- - Ionen in der Flüssigkeit gewährleisten die erforderlichen osmotischen Verhältnisse, für die GRAU et al. (1962) ein optimales Na^+ ($> 90 \text{ mmol/l}$) : K^+ -Verhältnis ($< 20 \text{ mmol/l}$) von 5 : 1 ansahen. Eine weitere wichtige Aufgabe dieser subembryonalen Flüssigkeit besteht in der Bereitstellung von Nahrungssubstanzen in aufnahmefähiger Form, die vom Dottersackkreislauf aufgenommen werden.

In den Studien, die zur embryonalen Ernährung durchgeführt wurden, stand vor allem die Frühphase der Embryonalentwicklung im Vordergrund. Dabei galt das Interesse den vorrangigen Energiequellen und den Minimalbedürfnissen des Embryos für Differenzierung und Morphogenese. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit niedermolekulare Substanzen einen günstigen Einfluß auf das embryonale Wachstum nehmen.

Die verschiedenen Arbeitsgruppen wählten unterschiedliche Entwicklungszeitpunkte, was bei einer Zusammenschau der Ergebnisse berücksichtigt werden muß, da sich in der Kürze

der Embryonalentwicklung beim Vogelembryo die Nahrungsbedürfnisse mitunter rasch verändern. SPRATT (1948) und FRASER (1957, 1959, 1960b) arbeiteten mit der Explantationstechnik, bei der der Embryo zusammen mit einen mehr oder weniger großen Anteil der extraembryonalen Membranen auf ein Nährmedium verbracht wurde. Die Embryonen wurden im Stadium des definitiven Primitivstreifens (18 - 21 Stunden) explantiert und die Kulturperiode erstreckte sich etwa über 22 - 23 Stunden. KLEIN (1962, 1968, 1971), YAGER und KLEIN (1974), HAYASHI und HERRMANN (1958) explantierten die Embryonen nach 40 Stunden Brutdauer und dehnten die Kultivierungsperiode bis zu 72 Stunden aus. GRAU (1962, 1968) und WALKER (1967) führten ihre Dottersackperfusionsversuche mit vier Tage alten Embryonen durch und konnten sie 3 - 4 Tage unter ihren Versuchsbedingungen halten.

SPRATT stellte fest, daß D- Glucose stets im Medium enthalten sein muß, um Morphogenese und Überleben von begrenzter Dauer zu gewährleisten. Die morphogenetischen Prozesse (z.B. Bildung des Primitivstreifens, der Kopffalten) benötigten weniger Energie, d.h. sie waren gegen eine Verminderung der D- Glukosekonzentration unempfindlicher als die eigentlichen Differenzierungsschritte. Wenn Zucker jedoch als einzige Nährstoffquelle zur Verfügung gestellt wurde, kam es zu einem geringeren Grad an Differenzierung. Proteine des Eiklars und des Dotters verbesserten Differenzierung und Wachstum (SPRATT 1950a). Das Kriterium der differenzierten Somiten setzte FRASER (1957, 1959, 1960b) zur Beurteilung der Effekte verschiedener Nahrungsfaktoren ein. Er zeigte, daß die jeweils dialysierbaren Eiweiß- und Dotterbestandteile die beste Somitendifferenzierung ermöglichen. Alanin in Verbindung mit D- Glukose und H_2S , das in Cystein umgewandelt wurde, konnte die beste Wirkung bei den freien Aminosäuren erzielen. Aus seinen Versuchen schloß FRASER, daß der Embryo zur Differenzierung seiner Somiten Glukose, freie Aminosäuren aus dem Dotter, einen hitzelabilen, nicht näher charakterisierten Faktor aus dem Dotter- bzw. Eiklardialysat und gewisse phosphorylierte Kohlenhydratzwischenprodukte benötigt. In einer weiteren Untersuchung (1960b) stellte er den

Effekt von Cystein auf die Somitenbildung heraus, der vermutlich durch Einbau des Cysteins in zelluläre Proteine zustandekommt und dadurch aktive proteingebundene SH- Gruppen als Disulfide vorliegen.

Um die Frage zu untersuchen, ob der Embryo sein körpereigenes Protein aus vom Dotter absorbierten intakten Proteinen oder aus freien Aminosäuren aufbaut, verbesserte KLEIN (1962) die Explantationsmethode von Spratt. Der Anteil extraembryonaler Membranen an den Explantaten wurde auf ein Minimum begrenzt und die Kulturperiode auf 48 bzw. 72 Stunden ausgedehnt. Dottereinschlüsse in mitexplantierten Membranen verfälschten die Ergebnisse und eine Verlängerung der Kulturperiode führte zur Erschöpfung der Dotterreserven. Klein stellte fest, daß explantierte Blastoderme auf einem chemisch definierten Medium wachsen können, jedoch nur in geringem Umfang. WALTER und MAHLER (1958) verabreichten ^{35}S - markierte Aminosäuren, Peptide und Proteine in den Dotter nichtinkubierter Eier. Der Einbau von ^{35}S in embryonales Protein zwischen Bebrütungstag 5 und 9 war aus allen Vorstufen vergleichbar. Aus diesem Befund schlossen Walter und Mahler, daß Proteine die bevorzugten Vorstufen sind, da die größere Konzentration an Proteinen im Dotter zu einer größeren Verdünnung der radioaktiven Vorstufe führen müßte. HAYASHI und HERMANN (1959) untersuchten die Fähigkeit von Explantaten, ^{14}C - Glycin unter Bedingungen schnellen Wachstums (Gesamteimum) und unter Bedingungen langsamen Wachstums (chemisch definiertes, proteinfreies Medium) einzubauen. Die Inkorporation des radioaktiven Markers war bei den langsam wachsenden Embryonen höher, deshalb nahmen Hayashi und Herrman an, daß schnelles Wachstum von der Aufnahme von Proteinvorstufen begleitet wird, die sich nicht mit dem zellfreien Aminosäurenpool mischen. KLEIN (1962) berechnete den Aminosäuren - N des Proteins auf ca. 60 - 80 mg/ml, im chemisch definierten Medium den totalen Aminosäuren - N auf 1,69 mg/ml. Wenn der Aminosäurenspiegel im chemisch definierten Medium über dieses Niveau angehoben wurde, konnte das Wachstum nicht verbessert werden. KLEIN (1968) verdünnte Gesamteimum, so daß der Gehalt an Aminosäuren- N dem im chemisch definierten Medium

entsprach. Die Embryonen auf diesem Medium zeigten eine etwas geringere Akkumulation an Protein- N als im chemisch definierten Medium. Klein nahm deshalb an, daß Proteine für schnelles Wachstum notwendig sind, weil sie hohe Konzentrationen bestimmter Aminosäuren liefern. Dieser Befund wurde noch dadurch gestützt, daß man mit Proteinquellen ähnlicher Zusammensetzung, wie den Dotterproteinen (z.B. Pferdeserum + Ovalbumin), ein ebenso gutes embryonales Wachstum erzielen konnte.

Schließlich wurde der quantitative Einfluß der einzelnen Proteinfractionen des Dotters bzw. des Eiklars (KLEIN 1968, YAGER und KLEIN 1974) auf das embryonale Wachstum untersucht. Es wurde deutlich, daß sich verschiedene Subfraktionen ergänzen (Proteinkomplementation). So verursachte von den Proteinfractionen des Dotters eine Mischung aus Lipovitellin (90%) und Livetin (10%) das größte Wachstum der Explantate. Ovalbumin und Conalbumin, Proteinfractionen des Eiklars wirkten in gleicher Weise. Bemerkenswert ist, daß sich Livetin durch eine seiner Subfraktionen, das Transferrin, das genauso wie das Conalbumin (Ovotransferrin) ein eisenbindendes Glykoprotein darstellt, ersetzen ließ.

Im Vergleich zur Protein-N- Akkumulation in den Embryonen wurde diese auch in den extraembryonalen Membranen bestimmt. Es ergaben sich in etwa doppelt so hohe Werte wie bei den Embryonen. HASSELL und KLEIN (1971) zeigten mit radioaktiv markiertem Ovalbumin, daß Nahrungsproteine von den Zellen der Area opaka aufgenommen und zu Aminosäuren abgebaut werden, die zum Embryo gelangen. Dagegen ist bekannt, daß einige Dotterlivetine intakt als embryonale Serumproteine fungieren. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Embryo in der frühen embryonalen Phase Nahrungsproteine aus dem Dotter benötigt, die Aminosäuren in großen Mengen zur Verfügung stellen und nicht durch Aminosäurenmischungen ersetzt werden können. In diesem Entwicklungsabschnitt scheinen die Dotterproteine Lipovitellin und Livetin die Fraktionen zu sein, die hauptsächlich das Wachstum der Embryonen beeinflussen. Der wesentliche Mechanismus besteht vermutlich in der Zerlegung der Proteine in der Area opaka in kleinere Bausteine (Pep-

tide, Aminosäuren), während die Aufnahme von intakten Proteinen nur in begrenztem Rahmen stattfindet.

Die Technik der Dottersackperfusion, die von GRAU (1968) und WALKER (1962, 1967) angewendet wurde, ermöglichte es bei älteren Embryonen den Dotter durch ein definiertes Medium zu ersetzen. So konnte der Bedarf des Embryos z.B. an einzelnen freien Aminosäuren untersucht werden. Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Valin und Tryptophan waren notwendig, damit die Embryonen die gesamte Kultivierungsdauer (ca. 3 - 4 Tage) überlebten. Die vier zuerst angeführten Aminosäuren förderten zudem noch das embryonale Wachstum. Es ist jedoch zu bedenken, daß bei der Perfusionstechnik mit Verfälschungen zu rechnen ist, da Restdotter in den Dottersackmembranzellen und Verunreinigungen durch Eiklarproteine die Ernährung des Embryos in einem bestimmten Umfang ermöglichen.

Embryonen benötigen für die Vielzahl der molekularen und zellulären Ereignisse, die Wachstum und Differenzierung betreffen, Energie. SPRATT (1958) setzte verschiedene Kohlenhydrate als alleinige Energiequelle dem Nährmedium von Explantaten zu und konnte damit die Differenzierung dieser Explantate unterstützen. Glucose hatte dabei die größte Wirksamkeit, Laktat oder Pyruvat als alleinige Energieträger konnten dagegen nur eine geringgradige Differenzierung bewirken. Auf der Grundlage dieser Befunde wurde vermutet, daß die Energiegewinnung über den Tricarbonsäurenzyklus und die Atmungskette im frühen embryonalen Stadium erst in geringem Maße verfügbar ist. Die dominierenden Abbauewege für die Glukose scheinen zunächst die Glykolyse und der Pentosephosphatzyklus zu sein. Die Glykolyse liefert metabolische Energie, der Pentosephosphatzyklus biosynthetische Substrate für die Bildung der Nukleinsäuren. In Phasen der Zelldifferenzierung sind die Enzymaktivitäten der Glykolyse erhöht, in Phasen der Zellproliferation die des Pentosephosphatzyklus. Untersuchungen an 3 - 4 Tage alten Embryonen zeigten, daß die Enzyme des Tricarbonsäurenzyklus und die Komponenten der Atmungskette in den Mitochondrien früher

embryonaler Zellen vorhanden sind. KUCERA (1984) schätzte, daß 18 - 24 Stunden alte Embryonen 30% bis 50% der Glucose oxidieren und den Rest zum größten Teil über aerobe Glykolyse in Laktat überführen.

3. Embryonale Entwicklung und Nukleinsäuresynthese

Die Nukleinsäuren regulieren embryonale Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge. Deshalb hatten die wenigen Arbeitsgruppen, die sich mit dem Nukleinsäurenstoffwechsel im Vogelembryo beschäftigten, die Zielvorstellung, daß bestimmte Phasen der Embryonalentwicklung sich auch in quantitativen Veränderungen der Nukleinsäuren äußern müßten.

EMANUELSSON (1958) untersuchte die Nukleinsäuren in der frühen embryonalen Phase (0- 60 Stunden). Er zeigte, daß Perioden der Zellvermehrung und der Zelldifferenzierung einander ablösen. Zellvermehrung ist dabei von einer hohen DNS- und niedrigen RNS- Konzentration gekennzeichnet, während in Perioden der Zelldifferenzierung die Verhältnisse sich umgekehrt gestalten. Die Analyse der verschiedenen embryonalen Körperpartien ergab in Übereinstimmung mit den Befunden morphogenetischer Untersuchungen, daß der Hensensche Knoten und der Kopffortsatz Zentren der Zellvermehrung darstellen. In einem Explantationsversuch konnte Emanuellson zudem zeigen, daß der Embryo ohne Dotter und Eiklar zur Synthese von DNS fähig ist. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse von SOLOMON (1957) gestützt, der Hühnerembryonen nach der Methode von Spratt explantierte und auf einem Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffreserve eine meßbare RNS- und DNS- Menge erhielt. Die im Dotter und Eiklar vorhandenen Nukleinsäuren dienten, so vermutete Solomon, als Reserven, die bei Bedarf von den Enzymen des Dottersackes in die Vorstufen zerlegt werden.

NOVIKOFF und POTTER (1948) stellten den quantitativen Verlauf der Nukleinsäuren zwischen Bebrütungstag 2 und 21 dar. Die DNS- Konzentration steigt auf einen Höchstwert am 15. Bebrütungstag und fällt bis zum 21. Tag steil ab. Die RNS- Konzentration zeigt einen Höchstwert an Tag 2 und 14, am Tag 5 erreicht sie einen Tiefstand. SHIMABAYASHI et al. (1964) fanden im Gegensatz zu Novikoff zwischen Tag 3 und 7 eine leichte Abnahme der DNS - Konzentration, die bis zum 14. Tag auf ein Maximum anstieg. Der Verlauf der RNS - Konzentration stellte sich wie bei Novikoff dar. Beide Untersucher stellten

heraus, daß sich die Nukleinsäurenhöchstwerte um den 14. Bebrütungstag mit einer Phase größten embryonalen Wachstums decken. CALDERERA und MORUZZI (1965) zeigten, daß zwischen dem Stoffwechsel der Nukleinsäuren und bestimmten Wachstumsfaktoren, den Polyaminen, eine enge Beziehung besteht. Veränderungen in der Nukleinsäurenkonzentration führten zu gleichsinnigen Veränderungen in der Konzentration der Polyamine Spermin und Spermidin. Die Nukleinsäuren erreichten einen Höchstwert an Tag 4 und fielen bis zum Bebrütungstag 10 deutlich ab. Ein zweites Maximum war nach 14 Bebrütungstagen vorhanden, von dem ausgehend sich die Nukleinsäurenkonzentration bis zum Schlupf deutlich verringerte. Die jeweiligen Höchstwerte stimmten mit Phasen größten embryonalen Wachstums überein. Den molekularen Mechanismus der Polyaminwirkung vermuteten Calderera und Moruzzi in einer Stimulierung der Enzyme, die an der Biosynthese der Nukleotide beteiligt sind.

4. Ausscheidungsprodukte des Protein- und Nukleinsäurenstoffwechsels

Das Hauptausscheidungsprodukt des Vogels ist die Harnsäure. Über die Harnsäure werden der Aminostickstoff, der im Proteinkatabolismus anfällt und die Purinbasen in die Allantoisflüssigkeit ausgeschieden. Der Aminostickstoff wird dabei über die Bildung von Glutamin und die Synthese des Puringerüsts bis zur Inosinsäure der Harnsäurebildung zugeführt (BLOOMFIELD et al., 1969). Adenosin wird über Inosin, Hypoxanthin und Xanthin, Guanosin über Guanin und Xanthin zu Harnsäure abgebaut. Das Enzym Xanthindehydrogenase (XDH) katalysiert die Umsetzung von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zur Harnsäure. XDH wurde beim Hühnerembryo bereits am fünften Entwicklungstag im Mesonephros nachgewiesen (CHAUBE, 1962), wo es mit der Degeneration des Organs am 15. Tag wieder abnimmt. Ab Tag 12 erhöht sich die XDH-Aktivität im sich entwickelnden Metanephros. Beim Hühnerembryo wird am 12. Tag das Löslichkeitsprodukt überschritten und die Harnsäure beginnt auszufallen.

Neben verschiedenen Vorstufen bzw. Zwischenprodukten (Inosin, Xanthosin, Xanthin, Hypoxanthin) werden in die Allantoisflüssigkeit auch sog. modifizierte Nukleoside abgegeben.

Sie sind in allen Nukleinsäurenformen gefunden worden, am häufigsten jedoch in der t-RNS, die einen Anteil von bis zu 16% enthält (LÜPKE und SEELA 1978). Die häufigste Modifizierung ist die Methylierung, die nach der Transkription am fertigen Polynukleotidverband erfolgt.

Entscheidend für die Bedeutung der beim Abbau der Nukleinsäuren anfallenden seltenen Nukleoside und Basen ist es, daß sie weder weiter abgebaut noch über den "salvage pathway" wiederverwertet werden können. Sie werden direkt im Urin ausgeschieden. Die Ausscheidungsmenge jeder seltenen Base stellt einen Normalwert dar. Für den Kliniker sind die seltenen Basen und Nukleoside deshalb von Bedeutung, weil bei neoplastischen Veränderungen deren Konzentration im Harn ansteigt (BOREK 1984; NASS 1985).

5. Methoden zur Kultivierung des Geflügelembryos

Die Entwicklung sog. "in-vitro" - Techniken hatte zum Ziel, den Embryo und andere Eikompartimente leicht verfügbar zu machen und Eingriffe zu erleichtern.

Im wesentlichen wurden vier Methoden eingesetzt: die Explantation von Embryonen, die Dottersackperfusion, die schalenlose Kultur von Geflügelembryonen und aus der zuletzt genannten Technik sich entwickelnd, die Kultivierung mit einer "Ersatzschale". Die Explantationstechnik und die Dottersackperfusion sind im Zusammenhang mit den embryonalen Ernährungsstudien bereits in Abschnitt 2 der Einleitung beschrieben worden.

Der Begriff "schalenlose Kultur" besagt, daß die Embryonen zusammen mit Dotter und Eiklar, jedoch ohne Eischalen und Schalenmembranen in ein Kulturgefäß verbracht werden. Im Gegensatz zur Explantationstechnik (Explantation des Embryos nach ca. 18 - 20 Stunden; Kulturperiode bis zu 72 Stunden) und zur Dottersackperfusion (Perfusion nach ca. 4 Tagen Bebrütungsdauer; Kulturperiode 3-4 Tage) sind die sich entwickelnden Embryonen und extraembryonalen Membranen nahezu über die gesamte Entwicklungsperiode für Beobachtungen und Manipulationen verfügbar. Gezielte Injektionen und Operationen können getätigt, resultierende Veränderungen (z.B. Motilität, Wachstum, Entwicklung der Blutgefäße) beobachtet werden.

In der Anwendung dieser Systeme ergab sich so ein vielfältiges Bild, z. B. Studien über tumorinduzierte Angiogenese mit neoplastischen Transplantaten auf der Chorionallantoismembran (AUERBACH et al., 1976), über Ca^{2+} - Metabolismus und Skelettmineralisation (NARBAITZ et al., 1978 und 1979; DUNN und BOONE, 1977; ONO und WAKASUGI, 1984), über embryonale Entwicklung und Differenzierung extraembryonaler Membranen (AUERBACH, 1976, NARBAITZ und KACEW, 1978, FITZHARRIS et al., 1980), über Transplantation von neuralem Gewebe auf die CAM (CORNER und RICHTER, 1972) und über Effekte toxischer Substanzen, wie z.B. Thalidomid (BOONE et al., 1974).

Die Kultivierung in Petrischalen nach AUERBACH (1974) und das

Verfahren nach DUNN (1976, 1977, 1978), bei dem die Embryonen in Plastikfoliensäckchen, die in Plastikdreifüße gespannt wurden, verbracht wurden, fanden die größte Verbreitung. Im zuerst angeführten Verfahren wurden drei Tage alte Embryonen in Petrischalen (20 x 100 mm) überführt. Der Ansatz wurde in eine Petrischale (25 x 150 mm) gestellt, die eine dünne Wasserschicht enthielt und mit einer Petrischale bedeckt. In den ersten drei Tagen fielen 50 % der Embryonen aus, nach 10 Tagen überlebten etwa 40 %, nach 16 - 17 Tagen immerhin noch 20 %. Dunn dagegen verwendete Plastikdreifüße, die aus einem Plastikring (Durchmesser 7,8 cm) mit drei 9 cm hohen Beinen bestanden. Eine Plastikfolie wurde über den Ring gespannt, ein drei Tage vorgebrütetes Ei mit einer kleinen Schraubzwinde gebrochen und die Eischale in zwei Teilen entfernt. Das Foliensäckchen wurde innen mit einem weiteren Plastikring (Durchmesser 5,0 cm; 13 mm dick) fixiert und mit einer Petrischale bedeckt.

Da 75 - 80 % des Kalziums in frisch geschlüpften Küken aus der Eischale kommt (ROMANOFF, 1967, CROOKS und SIMKISS, 1974), sahen viele Untersucher in der Minderversorgung mit Ca^{2+} die wichtigste Ursache für das Absterben der Embryonen in der schalenlosen Kultur. Der aktive Ca^{2+} - Transport aus der Schale beginnt zwischen Tag 12 und Tag 14 (JOHNSTON und COMAR, 1955). DUNN und BOONE (1977) stellten fest, daß in ovo der Ca^{2+} - Gehalt des Eies (ohne Schale) zwischen Tag 14 und Tag 20 linear zunimmt, die schalenlosen Kulturen jedoch auf dem Ausgangsniveau (Ca^{2+} aus Dotter und Eiklar) verblieben. Bis zum Bebrütungstag 12 bestand kein Unterschied im Ca^{2+} -Gehalt von kultivierten und in ovo bebrüteten Embryonen.

Wenn fehlendes Ca^{2+} ergänzt werden sollte, mußte die Frage beantwortet werden, inwieweit die Zellen der Chorionallantois-membran schalenloser Kulturen sich differenzieren bzw. funktionsfähig sind. NARBAITZ und JANDE (1978), die mit der Petrischalenmethode arbeiteten, untersuchten die CAM 13 und 15 Tage nach Brutbeginn. Sie zeigten, daß die für die Ca^{2+} -Mobilisierung und - Transport zuständigen "Villus cavity (VC)" - Zellen und "Capillary covering (CC)" - Zellen auch ohne Kontakt mit Schalenmembranen und Eischale annähernd den

gleichen Differenzierungsgrad wie in ovo erreichten. Jedoch stellte TUAN (1979) fest, daß die Ca^{2+} - Transportfunktion der CAM vom Vorhandensein des Eischalenkalziums abhängt. Die Ca^{2+} - Bindungsaktivität der CAM in schalenlosen Kulturen war im Vergleich zu der von schalenhaltigen Kontrollen erniedrigt, hingegen der Gehalt an CaBP (Calcium binding protein) erhöht. Biologisch aktiv war nur ein geringer Teil des CaBP in schalenlosen Kulturen (TUAN, 1983). Um die Defizite in der Kalziumversorgung auszugleichen, wurden am Bebrütungstag 11 von TUAN (1983) Eischalenstückchen mit anhaftenden Schalenmembranen auf die CAM von Embryonen gelegt, die nach der Technik von Auerbach kultiviert waren. Die Ca^{2+} - Transportaktivität der CAM- Teile, die den Stückchen direkt anhafteten und die Mineralisation des Gliedmaßen skeletts, das von der Kalziumminderversorgung am stärksten betroffen war, nahm zu.

Die Probleme mit der Kalziumversorgung und die Überlegung, den Vogelembryo für gentechnische Experimente einzusetzen, führten zur Kultivierungsmethode mit einer "Ersatzschale". Dazu wird ein System benötigt, das die Kultivierung zum frühest möglichen Zeitpunkt erlaubt und bei dem die kultivierten (und somit gentechnisch veränderten) Embryonen zum Schlupf kommen. ONO und WAKASUGI (1984) setzten den Inhalt von 60 Stunden vorbebrüteten Wachteleiern in das Hühnereischalendrittel, das den spitzen Pol enthält, um. Sie konnten bis Tag 14 eine Überlebensrate von 85 % (60 % in der schalenlosen Kultur) erzielen, jedoch war der Ca^{2+} - Gehalt der Embryonen nur halb so hoch wie in ovo. ROWLETT und SIMKISS (1986) verwendeten Eischalen von Truthühnern und trennten am stumpfen Eipol das obere Drittel ab. Der Inhalt von drei Tage bebrüteten Eiern wurde wie in der Methode von Dunn in Plastikfoliensäckchen verbracht und anschließend in die Empfängerschalen umgesetzt, die mit Petrischalen bedeckt wurden. Mit dieser Methode konnte am Bebrütungstag 15 eine Überlebensrate von 65,6 % und an Tag 21 20,0 % erreicht werden.

PERRY (1988) rückte das Problem, daß wesentliche Furchungs-

und Zellteilungsvorgänge bereits intrauterin ablaufen, in den Vordergrund. Das Blastoderm ist dadurch in seinen Teilungsvorgängen zum Zeitpunkt der Eiablage für gentechnische Eingriffe zu weit fortgeschritten. Perry setzte deshalb ein System ein, in dem das Ei von der Fertilisation bis zum Schlupf kultiviert werden konnte. Die Methode wurde je nach den unterschiedlichen Entwicklungsbedürfnissen des Embryos modifiziert. Das Ei, das von einer Kapsel dichten viskösen Eiklars umgeben ist, wurde aus dem Magnum entnommen und in ein 60 ml Becherglas gegeben. 8 - 16 ml Medium wurden eingefüllt, so daß der Flüssigkeitsspiegel auf Höhe der Keimscheibe lag, aber unterhalb des oberen Teils der Eiklarkapsel (System I). Nach 24 Stunden (entspricht dem gelegten Ei) wurde der gesamte Inhalt in eine Empfängerschale umgesetzt, mit Folie verschlossen, in eine horizontale Position verbracht und vollständig mit Medium gefüllt (System II). Der Ansatz wurde drei Tage lang bebrütet (entspricht der Hauptorganbildungsphase) und anschließend in System III umgesetzt, das mit der von ROWLETT und SIMKISS (1986) vorgestellten Methode übereinstimmte.

6. Zielsetzung

Wie im allgemeinen Teil aufgezeigt wurde, können Vogelembryonen unter in vitro-Bedingungen für eine relativ lange Zeitspanne am Leben erhalten werden. Dabei ist eine Vorinkubation des intakten Eies über mehrere Tage erforderlich. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Embryogenese in vitro gleich mit Beginn der Inkubation einzuleiten.

Nachdem diese Versuche erfolgreich waren, stellte sich die Frage, inwieweit die "Kultivierungsbedingungen" die Entwicklung beeinflussen. Da der in Kultur gehaltene Embryo nicht gewendet werden kann, war gleichzeitig zu klären, ob vom Unterlassen des Wendens allein schon Auswirkungen auf die Embryogenese zu erwarten sind.

Schließlich sollte untersucht werden, ob der Zeitpunkt, zu dem die Kultivierung einsetzt, für den Entwicklungsvorgang von Bedeutung ist.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Für die Untersuchungen wurden Eier der Japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) aus der institutseigenen Zucht verwendet.

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (D-Glucose-6-phosphate:NADP 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49), Hexokinase (ATP:D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (L-Alanine:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2) und Lactat-Dehydrogenase (L-Lactate:NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27) sowie der Test zur enzymatischen Bestimmung von L-Glutaminsäure waren von der Fa. Boehringer, Mannheim.

Die Radiochemikalien L-[U-¹⁴C]Glutaminsäure und [6-³H]Thymidin wurden von der Fa. Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen. Szintillator (Quickszint^R 212) war von der Fa. Zinsser, Frankfurt und Soluene^R-100 (Organlöser, 0,5 molares Quarternäres Ammoniumhydroxid in Toluol) von der Fa. Packard, Frankfurt.

Affi-Gel^R 601 waren von der Fa. Bio-Rad, München und Thymidin von der Fa. Sigma, München. Vorsäulen- bzw. analytisches Säulenmaterial für die HPLC-Analyse wurden von der Fa. Grom, Ammerbuch eingesetzt, Kaliumdihydrogenphosphat "Suprapur^R" sowie alle übrigen Chemikalien stammten von der Fa. Merck, Darmstadt.

2. Methoden

2.1. Kultivierung der Embryonen

Die Eischale wurde mit 70% Alkohol gereinigt und am stumpfen Pol des Eies wurde mit einer Augenschere ein kreisrundes Stück herausgeschnitten. Der Eiinhalt (Dotter mit der Keimscheibe und Eiklar) wurde vorsichtig unter Vermeidung mechanischer Insulte in ein Kulturgefäß aus Glas verbracht. In den Fällen, in denen das Blastoderm nicht nach oben zu liegen kam, wurde der Dotter an den Hagelschnüren mit einer Augenpinzette gedreht. Eier, bei denen die Area opaka und die Area pellucida nicht deutlich sichtbar waren, wurden ebenso ausgesondert wie solche, bei denen die Dottermembran beschädigt wurde. Das Kulturgefäß wurde mit einer Plastikfolie (Frapan S, Fa. Kraft) verschlossen. Die Folie war $18\mu\text{m}$ dick und wies folgende Durchlässigkeit auf:

Wasser	$4,5-5,0 \text{ g/m}^2$ in 24 Stunden
CO_2	$35-37 \text{ cm}^3/\text{m}^2$ in 24 Stunden/bar
O_2	$6,5-7,5 \text{ cm}^3/\text{m}^2$ in 24 Stunden/bar
N_2	$1,7-2,2 \text{ cm}^3/\text{m}^2$ in 24 Stunden/bar

Alle zur Kultivierung notwendigen Gerätschaften und Instrumente wurden im Autoklaven mit gesättigtem Wasserdampf bei 134°C 5 min. sterilisiert.

2.2. Versuchsgruppen und Brutbedingungen

Bei den Untersuchungen wurden die Eier i.d.R. in vier Gruppen aufgeteilt und miteinander verglichen:

- * kultiviert zum Zeitpunkt 0
- * kultiviert nach 48 Stunden Vorinkubation
- * nichtgewendet, intakt
- * gewendet, intakt

Die Eier wurden bei $37,8^\circ\text{C}$ und 65-70% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, gewendet wurde automatisch alle zwei Stunden mit Hilfe einer Wendeautomatik.

2.3. Analytische Methoden

2.3.1. Probennahme, Probenkonservierung und Applikation von Substanzen

Subembryonale Flüssigkeit und Allantoisflüssigkeit wurden mit Mikroliterspritzen (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz) entnommen. Dazu war es bei den schalenhaltigen Kontrollen notwendig, in der Nähe des spitzen Eipols ein kleines Stück der Schale zu entfernen. Die intakten Schalenmembranen wurden durchstoßen und die Probe entnommen.

Zur Gewinnung von Proben aus dem Eiklar wurden die Eier 3 min gekocht. Um Flüssigkeitsverluste zu vermeiden, wurde mit Parafilm die gesamte Oberfläche der kultivierten Eier bedeckt. Das Eiklargesamtgewicht wurde bestimmt und 100mg gekochtes Eiklar mit 0,33 molarer Perchlorsäure versetzt. Anschließend wurde mit einem Potter-Elvehjem Gerät homogenisiert, 5 min bei 10000g zentrifugiert, der Überstand abgehoben, mit NaHCO_3 neutralisiert und bei -20°C aufbewahrt. Abweichend davon wurde bei den Versuchen mit $^{42}\text{K}^+$ ein Aliquot aus dem unbehandelten Eiklar entnommen.

Embryonen wurden mit einer Augenschere und -pinzette aus dem Amnion präpariert. Bei -20°C wurden sie bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Für die Applikation von Substanzen in die subembryonale Flüssigkeit wurden die Eier in der gleichen Weise präpariert wie bei der Probennahme.

Sowohl die Probengewinnung wie auch die Verabreichung von Substanzen wurden am jeweiligen Bebrütungstag zwischen vollendeter 22. und 24. Inkubationsstunde ausgeführt.

2.3.2. Messung der Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration

Die Folie des Kultursystems wurde mit einer Kanüle (0,9 mm

i.D.) perforiert und mit einer 2ml- Spritze Luft aufgezogen. Die Probe wurde dann an einem Micro- Scholander- Apparat (Eschweiler, Kiel) gemessen, wobei in zwei Schritten die beiden Gase adsorbiert wurden (CO_2 mit KOH und O_2 mit Anthraquinon- β -sulfonsäure) und die jeweilige Volumendifferenz bestimmt wurde. Das Verhältnis der Differenzvolumina zum Ausgangsvolumen ergab dann die prozentuale Gaszusammensetzung (SCHOLANDER et al., 1942).

2.3.3. Volumenbestimmungen

Das Volumen der subembryonalen Flüssigkeitsschicht wurde mit Hilfe einer Farbstofflösung gemessen.

100 μl einer 0,03% Methylorangelösung wurden in das subembryonale Kompartiment injiziert und etwa 10 min bis zur Verteilung des Farbstoffes abgewartet. Je 100 μl Probe wurde an zwei gegenüberliegenden Stellen entnommen, 0,33 molare HClO_4 (1,3ml) zur Proteinausfällung zugesetzt und bei 10000xg 5 min zentrifugiert. Zum Überstand wurde 5 ml Chloroform zur Lipidextraktion gegeben und auf einem mechanischen Schüttler 30 min durchmischt. Das Zweiphasengemisch wurde bei 3000xg 10 min zentrifugiert und 1 ml von der wässrigen Phase abgehoben. Die Messung erfolgte photometrisch bei 496nm. Zur Kontrolle etwaiger Farbstoffverluste im Rahmen der Aufarbeitungsprozedur wurde vor Verabreichung des Farbstoffes 100 μl der subembryonalen Flüssigkeit entnommen, Methylorange in vergleichbarer Menge zugesetzt und in gleicher Weise wie die Proben aufgearbeitet.

Das Volumen der Allantois wurde über die Verdünnung von Inulin gemessen.

10 mg Inulin wurden bei 55°C im Wasserbad in 1 ml Aqua bid. gelöst und davon 100 μl in die Allantois injiziert. Nach 45 min wurden an zwei verschiedenen Stellen je 50 μl Probe entnommen und jeweils mit 100 μl Aqua bid. und 15 μl 25% HCl versetzt. Anschließend erfolgte die hydrolytische Spaltung des Inulins in D-Fructoseeinheiten bei 70°C im Wasserbad. D-Fructose wurde bei 334 nm photometrisch gemessen. In 1,55 ml

Gesamtvolumen enthielt der Test: $174 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ Triäthanolamin, $2,3 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ Mg^{2+} , $0,37 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ NADP, $2,61 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ ATP, $2,0 \text{ U/ml}$ Hexokinase, $1,0 \text{ U/ml}$ Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, $9,5 \text{ U/ml}$ Phosphoglucose-Isomerase und $50 \mu\text{l}$ Probe.

In beiden Bestimmungen wurden Standarddeichkurven angefertigt, in denen die Extinktionsänderung auf die entsprechenden Volumenwerte in ml bezogen wurde. Aus den Kurven wurden durch logarithmische Transformation die Standardgeraden berechnet.

2.3.4. Bestimmung von D-Glucose

D-Glucose wurde modifiziert nach BERGMAYER (1970) gemessen. Der Test enthielt in $1,21 \text{ ml}$ Gesamtvolumen: $249 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ Triäthanolamin $\text{pH}=7,5$, $83 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ ATP, $0,39 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ NADP, $5,7 \text{ U/ml}$ Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, $2,9 \text{ U/ml}$ Hexokinase. Die gebildete $\text{NADPH}+\text{H}^{+}$ -Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent. Sie wird bei 334 nm an einem Eppendorf-Photometer gemessen.

2.3.5. Bestimmung von L-Laktat

L-Laktat wurde modifiziert nach HOHORST (1970) gemessen. In $1,52 \text{ ml}$ Gesamtvolumen enthielt der Test: $410 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ Carbonat $\text{pH}=10,0$, $56,8 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ L-Glutamat, $2,0 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ NAD^{+} , $1,5 \text{ U/ml}$ Glutamat-Pyruvat-Transaminase, $14,0 \text{ U/ml}$ Lactat-Dehydrogenase. Die während der Reaktion gebildete $\text{NADH}+\text{H}^{+}$ -Menge ist der L-Laktat-Menge äquivalent. Die Messung erfolgte bei 366 nm und 25°C am Eppendorf-Photometer.

2.3.6. Messung und Meßgrößen des $^{42}\text{K}^{+}$ - Transportes

Im Physikdepartment der Technischen Universität München wurde ein ^{42}Ar - $^{42}\text{K}^{+}$ - Nuklidgeneratorsystem entwickelt, das das kurzlebige Isotop $^{42}\text{K}^{+}$ in ausreichender Aktivität lieferte. Da die Halbwertszeit von ^{42}Ar 33 Jahre beträgt und diejenige von $^{42}\text{K}^{+}$ lediglich $12,4 \text{ Std.}$, ist $^{42}\text{K}^{+}$ zudem zeitlich nahezu

unbegrenzt verfügbar.

Das Isotop emittiert sowohl beta- als auch gamma- Strahlen. Beta- Strahlen wurden mit dem Geiger- Müllerzähler gemessen, gamma- Strahlen mit einem Germaniumdetektor, wenn die Identifizierung des Energiespektrums notwendig war.

Die Effizienz des Zählers wurde mit verschiedenen Standardlösungen des Isotops kalibriert. Die injizierten Isotopenlösungen hatten in etwa 3,7kBq (0,1 μ Ci) Aktivität.

Die Proben wurden solange gezählt, bis mehr als 3000 "counts" registriert waren. Dies war i.d.R. innerhalb von 60 Minuten erreicht. Unter diesen Bedingungen schwankte die Genauigkeit der Messung um weniger als 2%.

Folgende Meßgrößen wurden berechnet:

$$T_0 = (A_0 / R_0) \cdot 100 \quad (1)$$

T_0 = Totale Transportrate (%)

A_0 = Gesamtaktivität in der subembryonalen Flüssigkeit in Bq

R_0 = Injizierte Aktivität in Bq

$$T_1 = (A_1 / R_0) \cdot 100 \quad (2)$$

T_1 = Transportrate pro Gramm subembryonaler Flüssigkeit (%)

A_1 = Aktivität pro Gramm subembryonaler Flüssigkeit in Bq

R_0 = Injizierte Aktivität in Bq

2.3.7. Analyse der freien Aminosäuren in der subembryonalen Flüssigkeit

200 μ l der subembryonalen Flüssigkeit wurden mit gleicher Menge 10%iger Aminosalicylsäure versetzt. Die Proben wurden 30 min geschüttelt, 10 min bei +4°C gekühlt, 30 min geschüttelt und bei 10000 x g 10 min zentrifugiert. Zum Überstand wurde Probenverdünnungspuffer (Tab. 1) in gleicher Menge zugesetzt und durch einen Membranfilter (Fa. Millipore, Eschborn, Porengröße 1,2 μ m) filtriert.

Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte mit einem Einsäulenverfahren an dem automatischen Aminosäurenanalysator LC 6000E der Firma Biotronik, München. Die Chromatographiesäule, die 180 mm lang war und 6 mm im internen Durchmesser hatte, war

mit dem Ionenaustauscherharz Durrum DC-6A gefüllt. Es wurde mit einem Fünf-Puffer-und Drei-Temperaturenprogramm gearbeitet. Tabelle 1 gibt die Zusammensetzung der Elutionspuffer und die jeweiligen Temperaturen an.

Im Anschluß an die Elution wurden die Aminosäuren mit Ninhydrinreagenz angefärbt. Die Ausbildung des blauvioletten Farbkomplexes erfolgte im kochenden Wasserbad und dieser wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch gemessen.

Das physiologische Standardgemisch enthielt die freien Aminosäuren in einer Konzentration von 5-10 nmol/100µl. L-Glutamin und L-Asparagin wurden erst kurz vor der Analyse dem Gemisch zugegeben. Aufgetragen wurden Probenvolumina zwischen 50µl und 250µl, die Konzentration der einzelnen Komponenten wurde von einem Rechner (Autolab, System I der Fa. Spectra Physics), bezogen auf obigen Standard, ausgedruckt.

Die Konzentration der freien Aminosäuren wurde auf das Gesamtvolumen der subembryonalen Flüssigkeit bezogen.

Tab.1: Zusammensetzung der Elutionspuffer

Puffer	A	B	C	D	E	F ¹	G ²
pH-Wert	2.70	3.20	3.40	4.00	3.40		2.00
Li ⁺ -Normalität	0.18	0.21	0.35	0.40	1.65	0.40	0.18
Lithiumcitrat g	16.9	15.4	16.9	16.9	16.9		16.9
Lithiumchlorid g		1.9	7.2	9.3	62.3		
HCl(37%) ml	12.0	11.0	10.0	7.0	8.0		13.5
Phenol g	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
Brij(12,5%) ml	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
Lithiumhydroxid g						16.8	
Thiodiglykol(25%) ml	2.0	2.0					80.0
Methanol ml	15.0	15.0					
Temperatur °C	36	36/52	52	52	52/68	68	

1) Regenerationslösung

2) Probenverdünnungspuffer

2.3.8. Bestimmung des Einbaus von 6[-³H]Thymin in die DNS

370 kBq (10 μ Ci)/100 μ l H₂O 6[-³H]Thymin (6[-³H]dT bzw. dT) wurde in die subembryonale Flüssigkeitsschicht verabreicht und 4 Stunden danach wurden die Embryonen nach Zugabe einer neunfachen Menge Saccharosepuffer (320 mol⁻³/l Saccharose, 3 mol⁻³/l MgCl₂, pH=7,3) bei 1200 Upm mit 8-12 Schlägen (Potter-Elvehem) homogenisiert.

Bestimmung der Konzentration von 6[-³H]dT im Homogenat:

Ein Aliquot von 100 μ l wurde entnommen und mit 1 ml Geweblöser (Solune^R-100) versetzt. Damit die Probe sich vollständig auflöste, wurde der Ansatz 24 Stunden stehengelassen und nach Zugabe von 10 ml Toluolszintillator (11g PPO/21 Toluol) gezählt.

Isolierung der Zellkerne:

Sie wurde modifiziert nach WIDNELL und TATA (1964) durchgeführt. Alle Schritte wurden zwischen 0°C und +4°C ausgeführt. Aus dem oben erstellten Homogenat wurden je 2x1 ml Aliquot entnommen und 10 min bei 120xg zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 μ l des obigen Puffers aufgenommen und mit 1 ml 60%iger Saccharoselösung auf einem Vortex-Rüttler gründlich durchmischt. In einer Eppendorf-Zentrifuge wurde dann 10 min bei 10000xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet, der aus intakten Zellkernen bestand, den weiteren Verarbeitungsschritten zugeführt.

Isolierung der DNS und Diphenylaminbestimmung modifiziert nach BURTON (1956):

Das Pellet wurde nun mit 3 x 1 ml 0,25 molarer Perchlorsäure ausgelöst und mindestens 30 min bei +4°C stehengelassen. Im nächsten Schritt wurde 15 min bei 5000xg zentrifugiert, der

Überstand verworfen und zum Niederschlag 1 ml 0,5 molare NaOH gegeben. Die Proben wurden 30 min bei Zimmertemperatur im Wasserbad geschüttelt, ein Aliquot von 0,5 ml entnommen und mit 0,5 molarer Perchlorsäure auf 5 ml aufgefüllt. Nach wiederum mindestens 30 min bei 40°C wurde 15 min zentrifugiert und der Niederschlag in 2x2,5 ml 0,5 molarer Perchlorsäure bei 95°C im Wasserbad 20 min hydrolisiert. Dann wurde 10 min bei 5000xg zentrifugiert und die Überstände vereinigt.

Zu 0,5 ml der vereinigten Überstände wurde 1 ml Diphenylaminlösung (88.7 mol⁻³/l Diphenylamin, 272 mol⁻³/l Schwefelsäure konz., 1.8 mol⁻³/l Acetaldehyd) gegeben, im Dunkeln 22-24 Stunden stehengelassen und bei 596 nm gemessen. Zur Herstellung einer Eichkurve wurden verschiedene Verdünnungen einer DNS-Standardlösung (50 µg/ml) angefertigt und die Proben auf den linearen Bereich dieser Kurve bezogen.

Radioaktivitätsmessungen:

Zu 100 µl des DNS-Hydrolysats wurden 10 ml Quickszint^R 212 gegeben und im Flüssigszintillationszähler (Tri-Carb, Modell 4530 ; Fa. Packard Instruments, Frankfurt) gemessen.

Zur Quenchkorrektur wurde automatisch das β -Spektrum eines externen Standards (²²⁶Ra) gemessen und ein sog. "Spektraler Index des externen Standards (SIE)" berechnet. In Beziehung zu der jeweiligen Zählzählbeute in % konnte auf der Basis des SIE die absolute Radioaktivität (dpm) von Proben mit unbekanntem Quenching berechnet werden.

2.3.9. Bestimmung der Proteinsynthese mit L-[U-¹⁴C]Glutaminsäure

3.7 kBq (0.1 µC)/100 µl H₂O L-[U-¹⁴C]Glutaminsäure wurde in die subembryonale Flüssigkeitsschicht verabreicht und nach 24 Stunden die Embryonen entnommen. Es wurde die radioaktive Markierung des Proteins (dpm/mg), die Verdünnung der mar-

ktierten L-Glutaminsäure im endogenen Pool (dpm/nmol L-Glutaminsäure) und damit die in 20 Stunden pro mg Protein eingebaute L-Glutaminsäure ermittelt. Dieser Parameter wurde als Maß für die embryonale Proteinsynthese herangezogen. Im einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

Probenvorbereitung:

Zu den gewogenen Embryonen wurde die vierfache Menge (w/v) Saccharosepuffer ($320 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ Saccharose, $3 \text{ mol}^{-3}/\text{l}$ MgCl_2 , pH=7,3) gegeben und mit einem Potter-Elvehjem-Gerät bei 1200 Upm und 8-12 Schlägen ein Homogenat hergestellt. Anschließend wurde zum Gesamthomogenat bzw. einem Aliquot (1 ml) Trichlor-essigsäure bis zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben, 10 min geschüttelt und bei $10000 \times g$ in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 10 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Trichloroessigsäure durch "Ausschütteln" mit Diäthyläther bis zu einem pH-Wert von ca. 7 entfernt. Dieser Überstand wurde dann zur Glutaminsäurebestimmung eingesetzt.

Das Proteinpellet wurde in 0,1 M NaOH (mit 2% SDS-Zusatz) gelöst und das Protein nach LOWRY et al. (1951) bestimmt.

L-Glutaminsäurefarbtest:

Zur Bestimmung der L-Glutaminsäure wurde ein Testkit von der Fa. Boehringer, Mannheim benutzt. Dabei wird L-Glutamat durch NAD^+ in Gegenwart von Glutamatdehydrogenase oxidativ zu α -Ketoglutarat desaminiert. Das entstandene $\text{NADH} + \text{H}^+$ setzt Jodnitrotetrazoliumchlorid in Gegenwart von Diaphorase zu Formazan um, das bei 492 nm gemessen werden kann.

Radioaktivitätsmessungen:

Ein Aliquot des Überstandes und des gelösten Proteins wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und an einem Tri-carb Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen (siehe. 2.3.8.). Die in 0,1 M NaOH gelösten Proteinproben mußten dabei im Abstand von einigen Stunden mehrmals gezählt werden,

bis die auftretende Chemilumineszenz abgeklungen war.

2.3.10. Harnsäurebestimmung

Harnsäure wurde nach der Uricase- Katalase Methode bestimmt (Fa. Boehringer, Mannheim), bei der Harnsäure zu Allantoin abgebaut und das freiwerdende H_2O_2 Methanol unter dem Einfluß von Katalase zu Formaldehyd oxidiert wird. Dieses lagert sich mit Acetylaceton und Ammoniak zum 3,5- Diacetyl- 1,4-dihydrolutidin zusammen. Die Intensität dieser farbigen Verbindung wird photometrisch bei 405 nm gemessen.

2.3.11. Bestimmung von Nukleosiden in der Allantoisflüssigkeit

Die Aufreinigung und Analyse häufiger und seltener Nukleoside wurde im Rahmen eines "off-line" - Verfahrens durchgeführt, bei der Probenvorbereitung und eigentliche HPLC - Analyse getrennt voneinander erfolgen.

2.3.11.1. Probenaufbereitung

Um eine exakte Analyse zu ermöglichen, wurden mindestens 100 µl Allantoisflüssigkeit benötigt. Die Probenvolumina wurden mit Milliporewasser auf 1,0 ml aufgefüllt und mit 300 µl 2,5 molarem Ammoniumacetatpuffer (pH = 9,5) versetzt. Anschließend wurde 5 min geschüttelt und bei 14000xg 10 min zentrifugiert.

2.3.11.2. Reinigung mit Hilfe eines borsäuresubstituierten Affinitätschromatographiegels

Boronatgel- Affinitätschromatographie für die selektive Anreicherung von Ribonukleosiden aus biologischen Flüssigkeiten wurde 1976 durch UZIEL, SMITH und TAYLOR eingeführt und durch DAVIES et al. (1977) verbessert. Eine Reihe von Untersuchern (GEHRKE et al. 1978, HAGEMEIER et al. 1983 u.a.) haben das Verfahren in der Zwischenzeit modifiziert.

Wir setzten für unsere Untersuchungen das AFFI-GEL^R601 (Fa. Biorad, München) ein. Dabei handelt es sich um ein Polyacrylamidgel, das als Ligand Phenylborsäure enthält. Niedermolekulare Substanzen mit 1,2 cis-diol Gruppen, wie z.B. Nukleoside, werden im alkalischen Milieu retiniert, im sauren Milieu dagegen eluiert.

Das Gel wurde über Nacht in 0,25 molarem Ammoniumacetatpuffer (NH_4OAc pH=8,8) zum Quellen gebracht und in silikonisierte Glassäulchen (100mmx5 mm i.D.) 40 mm hoch (Gelbett ca. 1000 μ l) eingefüllt. Die Elution der Säulchen wurde mit einer kleinen Säulenpumpe (Fa. Cenco, Breda, Niederlande) ausgeführt. Die Flußrate betrug 2-3 ml/min.

Zunächst wurden die Säulen mit 20 ml des obigen Puffers äquilibriert. Die Proben aus der Allantoisflüssigkeit wurden aufgetragen und mit 15ml Puffer nachgewaschen. Diese basische A-Fraktion, die die nicht retinierten Substanzen enthält, wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden die retinierten Nukleoside mit 15 ml 0,15 molarer Ameisensäure eluiert. Die saure B-Fraktion wurde bei -20°C gefroren und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde je nach eingesetzter Probenmenge in 0,2-1,0ml wiederaufgenommen und ein Aliquot in das HPLC-System injiziert.

Die Säulchen wurden schließlich in 20 ml 0,15 molarer Ameisensäure nachgewaschen und gelagert.

2.3.11.3. Auftrennung mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Auftrennung des Probenmaterials erfolgte durch Reversed-Phase-Chromatographie in einem HPLC-Gradientensystem, bestehend aus zwei Pumpen (114 M Solvent Delivery Module), Injektor (Altex 210 A Valve), Kontroller zur Pumpensteuerung (420 Kontroller), UV-Detektor (165 Variable Wavelength Detector) und Integrator (Shimadzu C-R6A Chromatopac).

Als analytische Säule wurde eine Spherisorb ODS-2, 250x4,6mm, 5 μ , (Fa. Grom, Ammerbuch) eingesetzt. Die Trennleistung der Säule wurde im eigenen Test (Methanol/Wasser 70:30, Flußrate

1,0 ml/min, 10 μ l Injektionsvolumen) mit Toluol (783,96 μ g/ml) überprüft. Eine Bödenzahl von ca. 72000/m war für eine optimale Trennung notwendig.

Die chromatographischen Bedingungen waren folgendermaßen:

Mobile Phase:	Pumpe A 0,01 mol ⁻³ /l KH ₂ PO ₄ (pH = 4,5) in 25min auf 40% Pumpe B (Methanol+Wasser : 3+2)
Flußrate:	1,2 ml/min
Injektionsvolumen:	50 μ l
Detektor:	UV 254nm; 0,1 AUFS
Integrator:	4mV/Vollausschlag

Die Peakidentifizierung erfolgte zunächst durch den Vergleich mit den Retentionszeiten eines Standardgemisches. Eine bekannte Menge des Standardgemisches wurde dann zur Probe zugesetzt und die Erhöhung der Flächenzahl eines bestimmten Peaks wurde als weitere Charakterisierung des Peaks verwendet. Die Gewißheit der Identifizierung wurde durch die sog. "Ratio" verstärkt. Darunter versteht man das Verhältnis der Absorption einer Substanz bei 254nm und 280nm, das für die Standards gemessen und mit dem Wert der interessierenden Peaks im Probenchromatogramm verglichen (Tab. 2) wurde. Das Absorptionsverhältnis ist auch ein Maß für die Reinheit des jeweiligen Peaks.

Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte über die Methode der absoluten Eichkurve, bei der mit Hilfe eines Standardchromatogramms der Integrator für die jeweilige Substanz einen Eichfaktor (eingesetzte Menge/Peakfläche) ermittelte.

Zur Prüfung der methodischen Bedingungen wurde die Linearität, die matrixabhängige Wiederfindung und die Präzision in % gemessen.

Die Linearität wurde mit Standardlösungen im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 nmol und 2,0 nmol/50 μ l Injektionsvolumen bestimmt. Die Korrelationskoeffizienten der zwischen der

Konzentration und der Peakfläche berechneten Regressionsgeraden lagen über 0,999.

Die Wiederfindung wurde durch den Zusatz einer bekannten Standardmenge zur Probe und die Präzision durch Mehrfachbestimmung derselben Probe beurteilt. Die Präzision ist als Prozent der Standardabweichung der Stichprobe vom Mittelwert angegeben.

Tab. 2: Verhältnis der Peakhöhen (254/280nm) für die Standards

Pseudouridin	1,75
Cytidin	-1,29 - (-1,38)
Uridin	2,05 - 2,08
Inosin	5,32 - 5,36
Guanosin	1,71 - 1,76
Xanthosin	2,07 - 2,13
1-Methylinosin	3,33 - 3,43
1-Methylguanosin	1,64 - 1,73
N ² -Methylguanosin	1,73 - 1,81

Tab. 3: Matrixabhängige Wiederfindung und Präzision (n=6).

Nukleosid	zugesetzte Menge	Wiederfindung	Präzision
	nmol/ml	%	%
Pseudouridin	12,8	92,4	2,2
Cytidin	16,0	91,8	4,0
Uridin	16,0	100,6	2,0
Inosin	16,0	96,7	2,0
Guanosin	16,0	91,5	1,4
Xanthosin	16,0	97,9	2,3
1-Methylinosin	16,0	91,6	4,8
1-Methylguanosin	16,0	96,8	4,1
N ² -Methylguanosin	16,0	81,1	3,4

2.4. Statistische Auswertung

Für die statistischen Berechnungen wurde das PC-Programm SPSS/PC+ (SPSS Inc., 1986) benutzt.

Die Ergebnisse der gemessenen analytischen Parameter sind in den Abbildungen und Tabellen stets als Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung angegeben. Ebenfalls eingetragen sind die Versuchszahlen.

In den Fällen, in denen alle vier Versuchsgruppen miteinander verglichen werden, sind zur besseren graphischen Darstellung die Versuchsgruppen auf zwei Abbildungen verteilt, jedoch in das statistische Prüfverfahren wurden alle vier Versuchsgruppen miteinbezogen.

Bei der Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bzw. innerhalb der Gruppen wurde eine einfache Varianzanalyse und der Scheffé-Test für mehrfache Mittelwertsvergleiche gerechnet. Signifikante Unterschiede wurden mit Buchstaben gekennzeichnet und in der Erläuterung die jeweilige Gruppe angegeben mit der verglichen wurde.

Waren zwei Mittelwerte miteinander zu vergleichen, so wurden der F-Test und der Student t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede sind in diesem Fall durch Sternsymbole gekennzeichnet.

Feuchtgewicht, DNS - und Proteingehalt der Embryonen wurden absolut berechnet und eine zeitbezogene Abhängigkeit ermittelt. Für die Anpassung der Werte wurde folgende Modellfunktion als geeignet angesehen:

$$y = a \cdot x^b$$

Wobei y das Feuchtgewicht in mg oder den DNS- Gehalt in µg oder den Proteingehalt in mg darstellt. x steht für die Inkubationszeit in Tagen, b gibt an, mit welcher Geschwindigkeit und in welcher Richtung sich der jeweilige Parameter bei zunehmender Inkubationszeit ändert. a stellt einen Skalierungsfaktor dar. Zur Berechnung der Konstanten a und b aus den experimentellen Daten wurde die logarithmische Form der

Gleichung eingesetzt:

$$\log y = \log a + b \cdot \log x$$

Die Konstanten wurden auf signifikante Unterschiede geprüft (SACHS, 1982).

Wellenlänge 254 nm.

- 1 Pseudouridin
- 2 Cytidin
- 3 Uridin
- 4 Inosin
- 5 Guanosin
- 6 Xanthosin
- 7 1-Methylinosin
- 8 1-Methylguanosin
- 9 N²-Methylguanosin

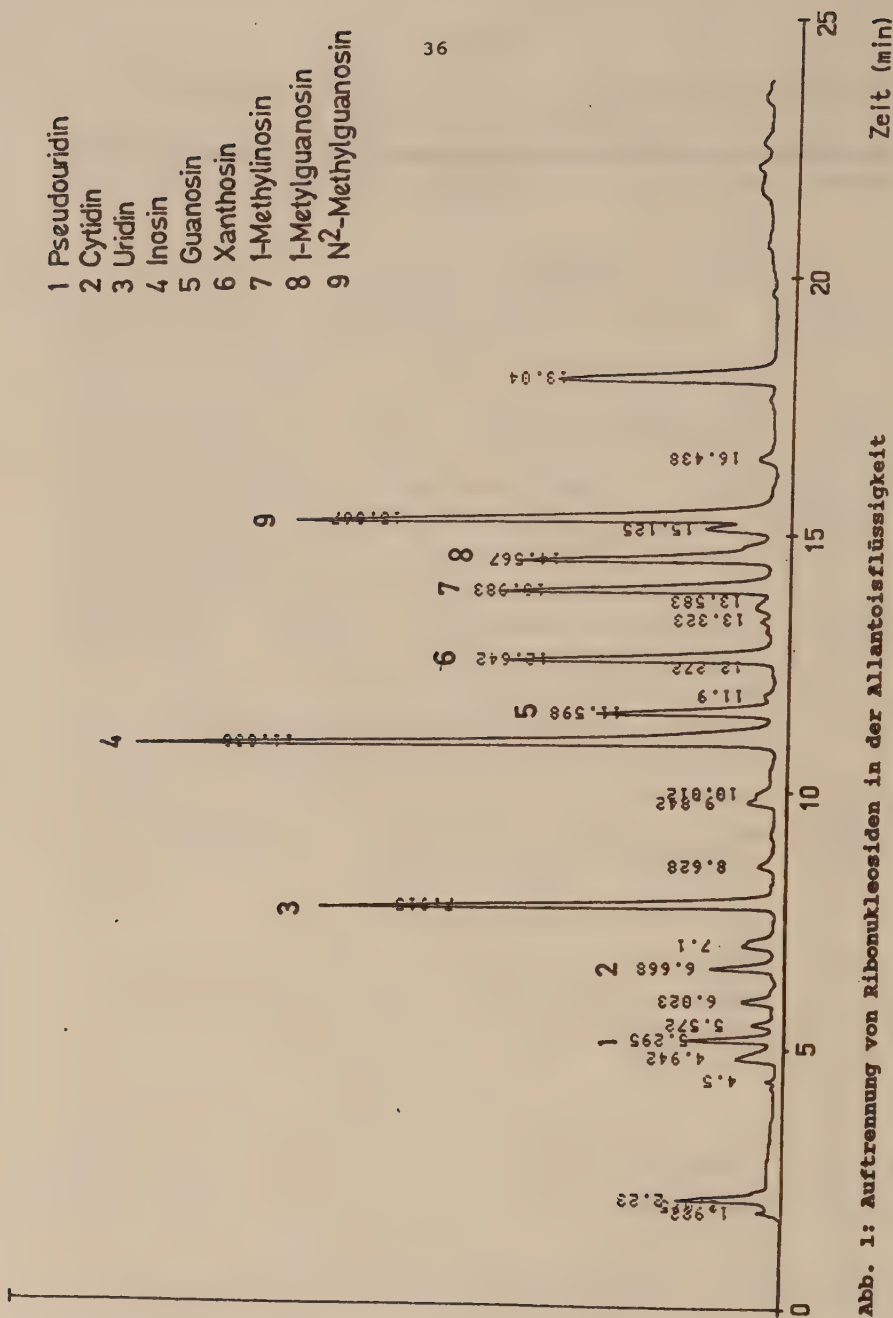


Abb. 1: Auftrennung von Ribonukleosiden in der Allantoisflüssigkeit
Chromatographische Bedingungen siehe Methodenteil 2.3.11.3.

III. ERGEBNISSE

A. Entwicklung der Kultivierungsmethode

Wie in der Einleitung dargestellt wurde, gibt es eine Reihe von Methoden, um den Embryo eines bebrüteten Eies zu kultivieren. Diese zeichnen sich dadurch aus, daß die Eier vor der Kultivierung 48 bzw. 72 Stunden vorbebrütet werden. Es stellte sich nun die Frage, unter welchen Bedingungen das gelegte Ei vom Zeitpunkt 0 an kultiviert werden kann.

Das Blastoderm wird in ovo von feuchten Membranen umhüllt und somit vor dem Austrocknen geschützt. In Kultursystemen fehlen die Schalenmembranen und es mußte eine Möglichkeit gefunden werden, das drohende Austrocknen der Keimscheibe zu verhindern.

Im Institut für Physiologie konnte gezeigt werden, daß unter in vitro-Bedingungen das Übersichten des Dotters mit flüssigem Eiklar zum Einsetzen der Embryonalentwicklung führte. Diese Methode hatte jedoch schwerwiegende Nachteile (Ablaufen des Eiklars vom Dotter, Störung der osmotischen Verhältnisse), die einer Weiterentwicklung entgegenstanden. Von diesem Befund ausgehend, wurde ein System entwickelt, das den Wasserverlust weitgehend einschränkte. Dies wurde dadurch erreicht, daß ein konisch zulaufendes Glasgefäß (29 ml) mit einer weitgehend wasserundurchlässigen Folie verschlossen wurde (Abb. 2). Unter diesen Bedingungen setzte die Embryonalentwicklung ein, was an den sich entwickelnden Blutinseln und der beginnenden Herztätigkeit (nach ca. 60 Stunden) zu sehen war. Der Wasserverlust dieser kultivierten Eier, der in Tabelle 4 als Gewichtsverlust angegeben ist, war unter diesen Bedingungen wesentlich kleiner als der intakter Eier. Gleichzeitig schränkte die Folie den Austausch von O_2 und CO_2 mit der Umgebung drastisch ein. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, nahm der prozentuale Anteil von O_2 zwischen Tag 3 und 6 deutlich ab, während beim CO_2 ein Anstieg zu verzeichnen war. Dem wurde durch Perforation der Folie mit einer dünnen Kanüle (0,38 mm i.D.) entgegengewirkt. Die Perforation erfolgte nach

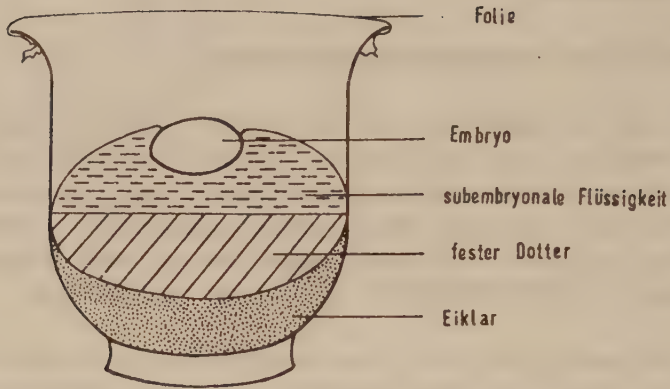


Abb. 2: Kulturgefäß.

Tab. 4: Gewichtsverlust normal bebrüteter und kultivierter Eier

	Inkubationszeit (Tage)			
	2	3	4	5
	mg /Stunde			
in ovo	4,0±0,8	3,2±0,7	3,2±0,8	3,5±0,8
kultiviert	2,4±0,9*** (19)	1,9±0,5*** (18)	2,0±0,4*** (15)	2,2±0,9** (7)
kultiviert +perforiert	(22)	2,2±0,3** (18)	3,1±1,2 (17)	2,7±0,3 (10)
		(6)	(13)	(12)
*p<0,05	**p<0,01	***p<0,001		

% CO₂

O₂%

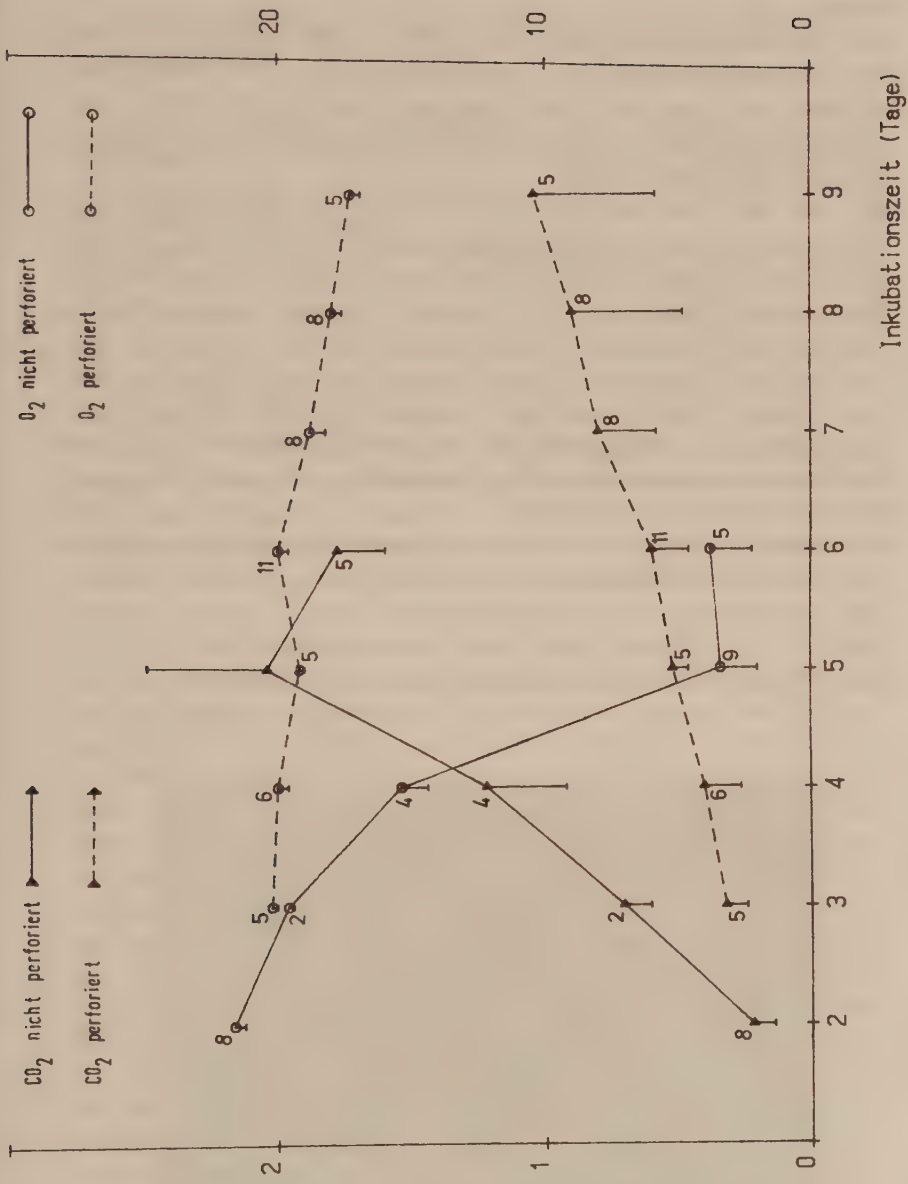


Abb. 3: O₂- und CO₂- Konzentrationen im Kulturgefäß

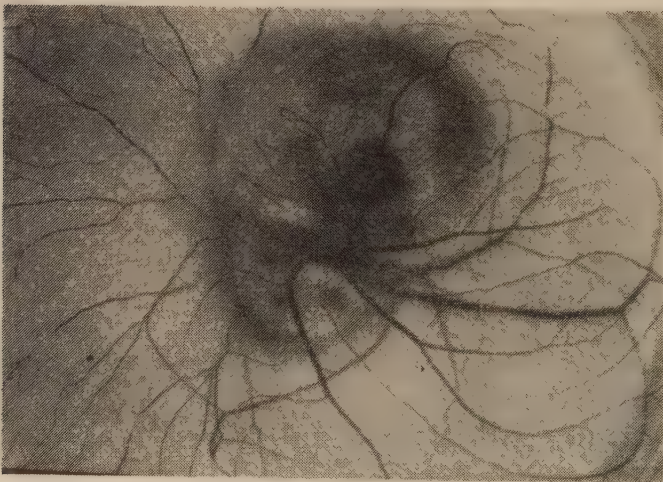
72 Stunden, wenn das Einsetzen der Embryogenese beobachtet wurde.

Mit der Perforation der Folie wurde nicht nur die O_2 - und CO_2 - Zusammensetzung der eingeschlossenen Luft beeinflusst, sondern auch der Wasserverlust des kultivierten Eies. Die Verlustrate nahm zu und erreichte so Werte, wie sie auch in ovo auftreten (Tab. 4).

Bei den auf diese Weise kultivierten Eiern setzte in 90- 95% der Fälle die Embryonalentwicklung ein, die alle bis zum Tag 3 überlebten. Bis zum Tag 8 überlebten davon in etwa 60% der kultivierten Embryonen. Im weiteren Verlauf der Inkubation starben die Embryonen vermehrt ab, so daß am Tag 16 noch etwa 10- 20% der Embryonen am Leben waren. Auffallend war zudem, daß unter Kulturbedingungen eine große Zahl von Spontanmißbildungen zu beobachten war. Es waren teilweise bis zu 30% der Embryonen betroffen, die frühzeitig abstarben und somit die Überlebensraten senkten.

Ein unter diesen in vitro- Bedingungen kultivierter Embryo ist in Abbildung 4 zu sehen.

Abb. 4: Ein in Kultur gehaltener Embryo (5 Tage)



B. Bildung und Zusammensetzung der subembryonalen Flüssigkeit

1. Flüssigkeitstransfer zwischen Eiklar und subembryonalem Kompartiment

In den folgenden Untersuchungen interessierte, ob die Kultivierung Auswirkungen auf die Bildung der subembryonalen Flüssigkeit hat. Gleichzeitig sollte der Einfluß des Wendens herausgearbeitet werden.

Diese Versuche wurden mit vier verschiedenen Gruppen durchgeführt. Die intakten Eier wurden in eine gewendete und eine nichtgewendete Gruppe unterteilt, um die Effekte des Wendens darzustellen. Die kultivierten Eier wurden ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt, von denen die eine erst nach einer Vorbebrütungszeit von 48 Stunden, die andere mit Beginn der Inkubation kultiviert wurde. Damit sollte herausgefunden werden, ob der Zeitpunkt der Kultivierung einen Einfluß auf die untersuchten Parameter hat.

Da das subembryonale Kompartiment zu 90% aus Flüssigkeit besteht und diese Flüssigkeit zum größten Teil aus dem Eiklar stammt, wurde zunächst der Transfer von Flüssigkeit aus dem Eiklar in das subembryonale Kompartiment verfolgt. Um ein Maß für den Wasserverlust des Eiklars zu erhalten, wurde dessen Gewichtsverlust bestimmt, da zu diesem Zeitpunkt das Wasser den gewichtsbestimmenden Teil der Eiklarabnahme darstellt.

In den gewendeten, intakten Eiern kam es nach 48 Stunden zu einer deutlichen Abnahme des Eiklargewichts, die sich bis zum Inkubationstag 6 fortsetzte. Die nichtgewendeten, intakten Eier verhielten sich ähnlich, die Abnahme war jedoch nicht so ausgeprägt.

In der vom Zeitpunkt 0 an kultivierten Gruppe war gegenüber den intakten Eiern bereits am Tag 2 ein deutlich niedrigeres Gewicht vorhanden. Im weiteren Verlauf verringerte sich das Eiklargewicht nicht in dem Umfang wie bei den intakten Eiern. Die vorbebrütete Gruppe verhielt sich ähnlich, der Gewichtsverlust war jedoch geringgradig höher. Insgesamt ist die Abnahme des Eiklargewichtes in den kultivierten Gruppen nahezu linear, während sie in den intakten Eiern einen eher

sigmoiden Verlauf nimmt.

Erste meßbare Mengen an subembryonaler Flüssigkeit waren am Tag 3 (Abb. 6) vorhanden. An diesem Bebrütungstag war das Volumen in den gewendeten Eiern höher als in den drei anderen Gruppen. Im weiteren Verlauf nahmen die Volumenwerte in den nichtgewendeten und den kultivierten Eiern bis Tag 6 zu, während sie in den intakten, nichtgewendeten Eiern annähernd konstant blieben. Die Werte der nichtgewendeten Eier lagen i.d.R. über den entsprechenden Werten der gewendeten Gruppe. Ab Tag 6 wurden die Volumenwerte der subembryonalen Flüssigkeit innerhalb aller Gruppen kleiner.

Werden die Veränderungen im Eiklargewicht mit dem Volumen des subembryonalen Kompartiments verglichen, so fällt auf, daß einer Gewichtsabnahme im Eiklar nur bei den nichtgewendeten, intakten Eiern eine Zunahme in der subembryonalen Flüssigkeit gegenübersteht.

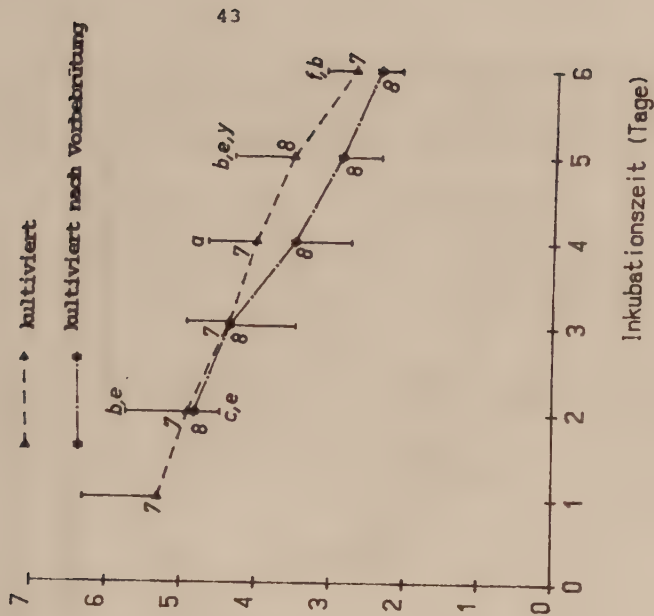
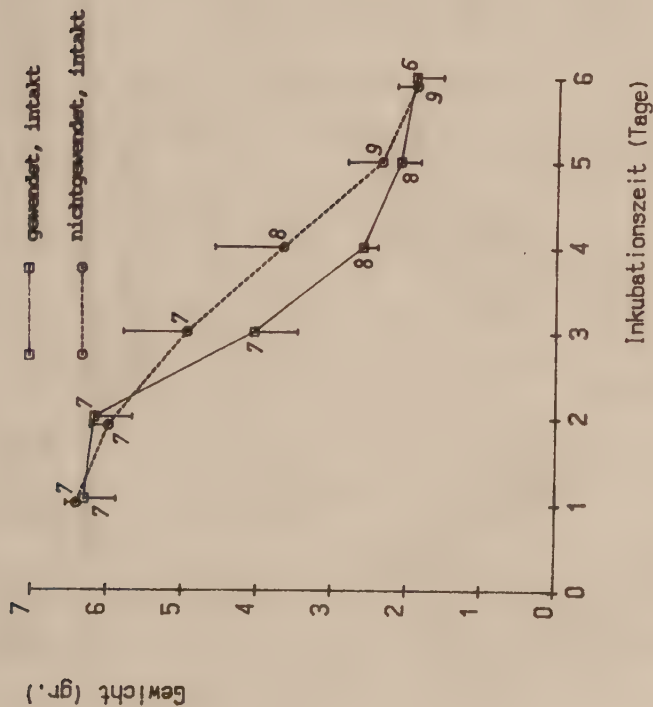


Abb. 5: Verlauf des Eiklargewichtes

$b_p < 0,01$ i. V. mit der gewendeten intakten Gruppe
 $c_p < 0,001$ i. V. mit der nichtgewendeten intakten Gruppe
 $d_p < 0,01$ i. V. mit der gewendeten intakten Gruppe

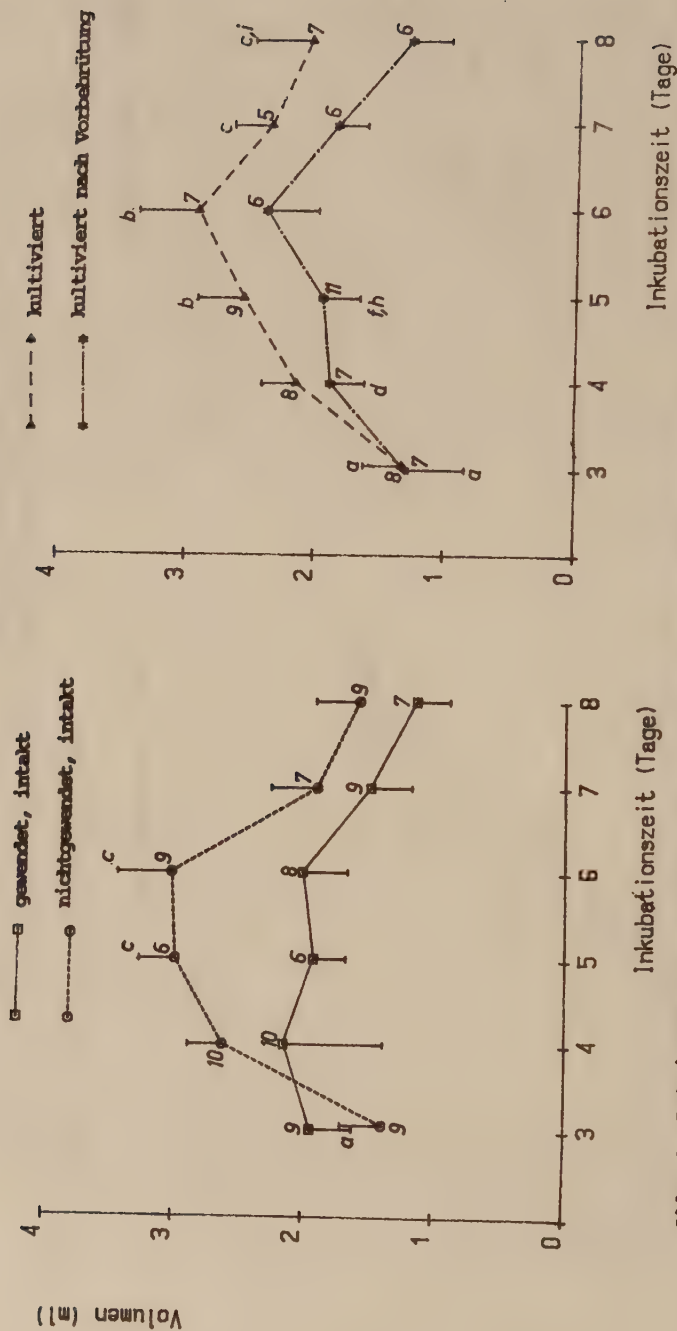


Abb. 6: Entwicklung des Volumens der subembryonalen Flüssigkeit

$a_p < 0,05$ $b_p < 0,01$ $c_p < 0,001$ i. V. mit der gewendeten intakten Gruppe
 $d_p < 0,05$ $f_p < 0,001$ i. V. mit der nichtgewendeten intakten Gruppe
 $h_p < 0,01$ $i_p < 0,001$ i. V. mit der kultivierten Gruppe

Da bekannt ist, daß die Allantoisflüssigkeit aus der subembryonalen Flüssigkeit gebildet wird, wurde ergänzend das Volumen der Allantoisflüssigkeit bestimmt (Tab. 5).

Die Allantoisflüssigkeit konnte erst am Tag 7 zuverlässig gemessen werden, in einer Phase, in der das Volumen der subembryonalen Flüssigkeit bereits wieder abnahm.

In Tabelle 5 sind die Werte des Allantoisvolumens zwischen Bebrütungstag 7 und 9 aufgeführt. Die Embryonen der kultivierten Gruppen bildeten eine geringere Menge an Flüssigkeit aus, als die intakten Eier. Die höchsten Werte waren bei den Embryonen der gewendeten Eier zu finden.

Tab. 5: Volumen der Allantoisflüssigkeit

	Inkubationszeit (Tage)		
	7	8	9
	Volumen in ml		
gewendet, intakt	0,85±0,15 (5)	1,53±0,26 (8)	1,83±0,44 (11)
nichtgewendet, intakt	0,79±0,17 (6)	1,02±0,26 ^b (12)	1,38±0,50 (7)
kultiviert	0,54±0,18 ^a (6)	0,72±0,31 ^c (9)	1,16±0,37 ^a (6)
kultiviert nach Vorb.	0,48±0,15 ^{b,e} (11)	0,75±0,18 ^c (8)	1,02±0,23 ^b (8)
^a p<0,05 ^b p<0,01 ^c p<0,001	i. V. mit den gewendeten, intakten Eiern		
^e p<0,01	i.V. mit den nichtgewendeten, intakten Eiern		

2. Transport von D- Glucose und $^{42}\text{K}^+$

Wie bereits erwähnt, stellt den gewichtsbestimmenden Anteil der Eiklarabnahme das Wasser dar. Es werden jedoch auch D- Glucose und anorganische Ionen aus dem Eiklar in das subembryonale Kompartiment transportiert. Um dieses Geschehen nachzuvollziehen, wurde in Vorversuchen D- Glucose bzw. $^{42}\text{K}^+$ in das Eiklar appliziert (Tab. 6 und 7) und die Auswirkungen geprüft. Es zeigte sich, daß in beiden Fällen die applizierten Substanzen in die subembryonale Flüssigkeit wanderten. In den weiteren Untersuchungen wurde im Falle von D- Glucose die Veränderung im Eiklar dem D- Glucosespiegel der subembryonalen Flüssigkeit gegenübergestellt. Im Fall von $^{42}\text{K}^+$ wurden die Transportraten gemessen.

Tab. 6: Der Einfluß exogener D- Glucose auf den D- Glucosegehalt der subembryonalen Flüssigkeit

	Inkubationszeit (Tage)	
	4	6
	$\mu\text{mol/Volumen}$	
-	13,72 $\pm$ 3,75 (10)	3,26 $\pm$ 2,11 (9)
10 mg D- Glucose	21,52 $\pm$ 5,39** (7)	13,92 $\pm$ 3,17*** (9)

10 mg D- Glucose wurden in 100 μl Aqua bid. gelöst und am Beginn der Bebrütung in das Eiklar appliziert.

p<0,01 *p<0,001

Tab. 7: Anreicherung von $^{42}\text{K}^+$ in der subembryonalen Flüssigkeit (Einzelwerte)

	Inkubationstag	
	3	4
	kBq	
Eiklar	4,514	5,032
subembryonal	0,1813	0,392

2.1. D- Glucose im Eiklar und in der subembryonalen Flüssigkeit

Die Abnahme des Glucosegehalts im Eiklar (Abb. 7) zeigte einen annähernd gleichen Verlauf wie die des Eiklargewichts. Nachdem der Glucosegehalt bei den intakten Eiern 48 Stunden konstant blieb, nahm er anschließend bis Tag 6 in allen Gruppen deutlich ab.

Bei den kultivierten Gruppen war ein konstanter Abfall der Eiklarglucose von Tag 1 bzw. Tag 2 an gegeben. Zudem kam es zu einer geringeren Abnahme des D- Glucosegehalts, was sich in einem flacheren Kurvenverlauf darstellte. Daraus resultierten höhere D- Glucosewerte im Eiklar zwischen Tag 4 und 6 als bei den intakten Eiern.

Vergleicht man den Verlauf der subembryonal vorliegenden D- Glucose mit den Veränderungen im Eiklar, so fällt auf, daß nur im Fall der nichtgewendeten, intakten Eier der D- Glucosegehalt vom 3. zum 4. Tag deutlich zunahm. Bei den kultivierten Eiern blieb er annähernd konstant, während bei den gewendeten, intakten Eiern bereits eine Abnahme des D- Glucosegehalts einsetzte. Diese Abnahme war in den übrigen Gruppen erst nach Tag 4 zu beobachten.

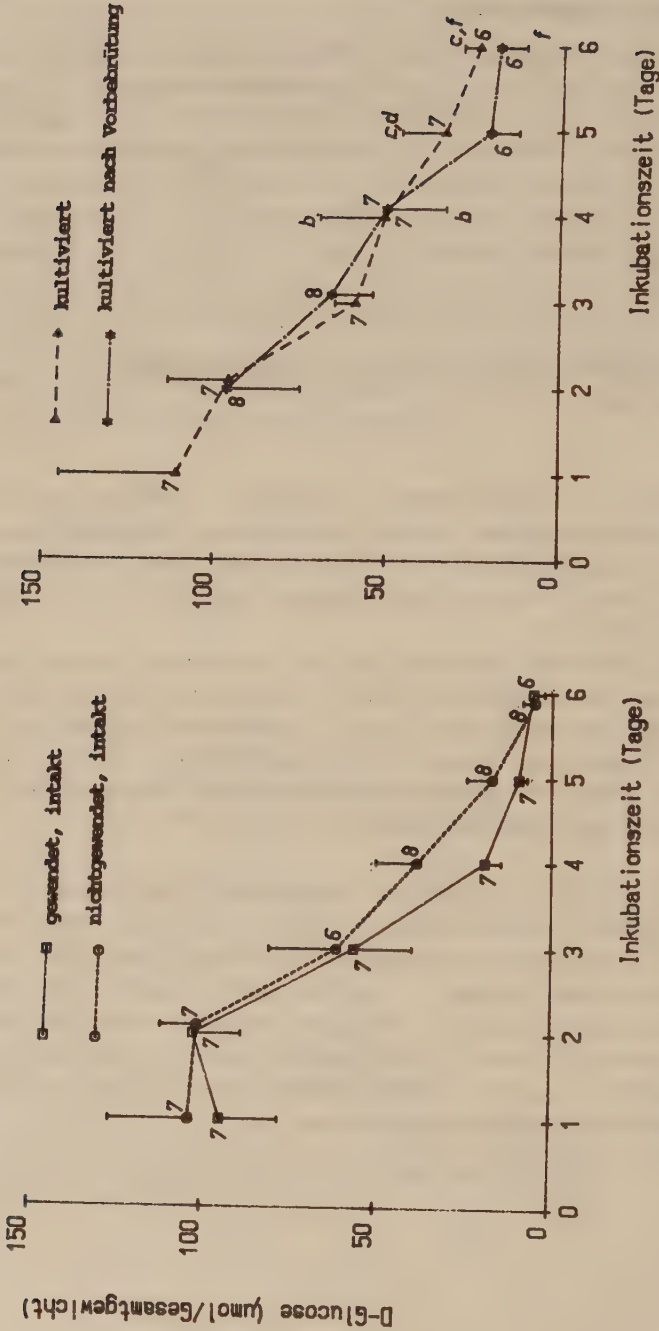


Abb. 7: D- Glucose im Eiklar

$b_p < 0,01$ $C_p < 0,001$ i. V. mit der gewendeten, intakten Gruppe
 $d_p < 0,05$ $f_p < 0,001$ i. V. mit der nichtgewendeten, intakten Gruppe.

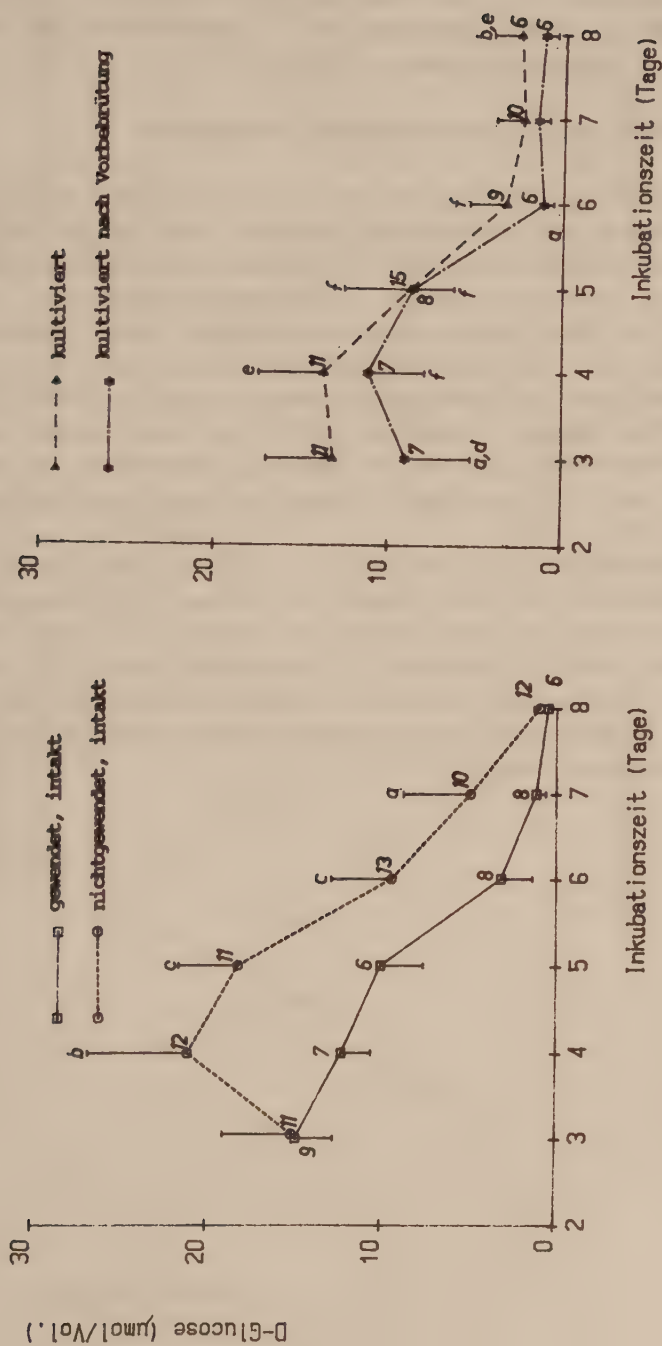


Abb. 8: Verlauf des D- Glucosegehaltes in der subembryonalen Flüssigkeit

$a_p < 0,05$ $b_p < 0,01$ $c_p < 0,001$ i. V. mit der gewendeten intakten Gruppe
 $d_p < 0,05$ $e_p < 0,01$ $f_p < 0,001$ i. V. mit der nichtgewendeten intakten Gruppe

Es stellte sich die Frage, ob der aufgezeigte Unterschied in der D- Glucose durch unterschiedliche Umsetzung zustandekommt. Deshalb wurde ergänzend der L- Laktatgehalt der subembryonalen Flüssigkeit gemessen (Abb. 9).

2.2. L-Laktat in der subembryonalen Flüssigkeit

In den intakten Eiern war am Tag 4 der Höchstwert erreicht, von dem aus in den gewendeten, intakten Eiern das L- Laktat bis Tag 8 kontinuierlich abnahm. Nichtgewendete und gewendete Eier waren nicht signifikant voneinander verschieden. Die von Tag 0 an kultivierten Eier vergrößerten ihren L-Laktatgehalt bis Tag 5 um mehr als das Doppelte und lagen in ihren Werten ab diesem Zeitpunkt statistisch signifikant höher als in den drei anderen Gruppen. Wurden die Eier jedoch nach einer Vorbebrütungszeit von 48 Stunden kultiviert, so fiel auf, daß der L- Laktatgehalt diese extremen Veränderungen nicht zeigte.

Dieser außergewöhnliche Anstieg im L- Laktatspiegel führte zu der Überlegung, daß eine Hypoxie die Ursache hierfür sein könnte. Es wurde deshalb versucht, durch eine vorzeitige Perforation die O_2 - Versorgung zu verbessern (Tab. 8). Dies bewirkte jedoch keine Veränderung in der Konzentration von L- Laktat. Eine Perforation zu einem späteren Zeitpunkt hatte ebenfalls keinen Einfluß.

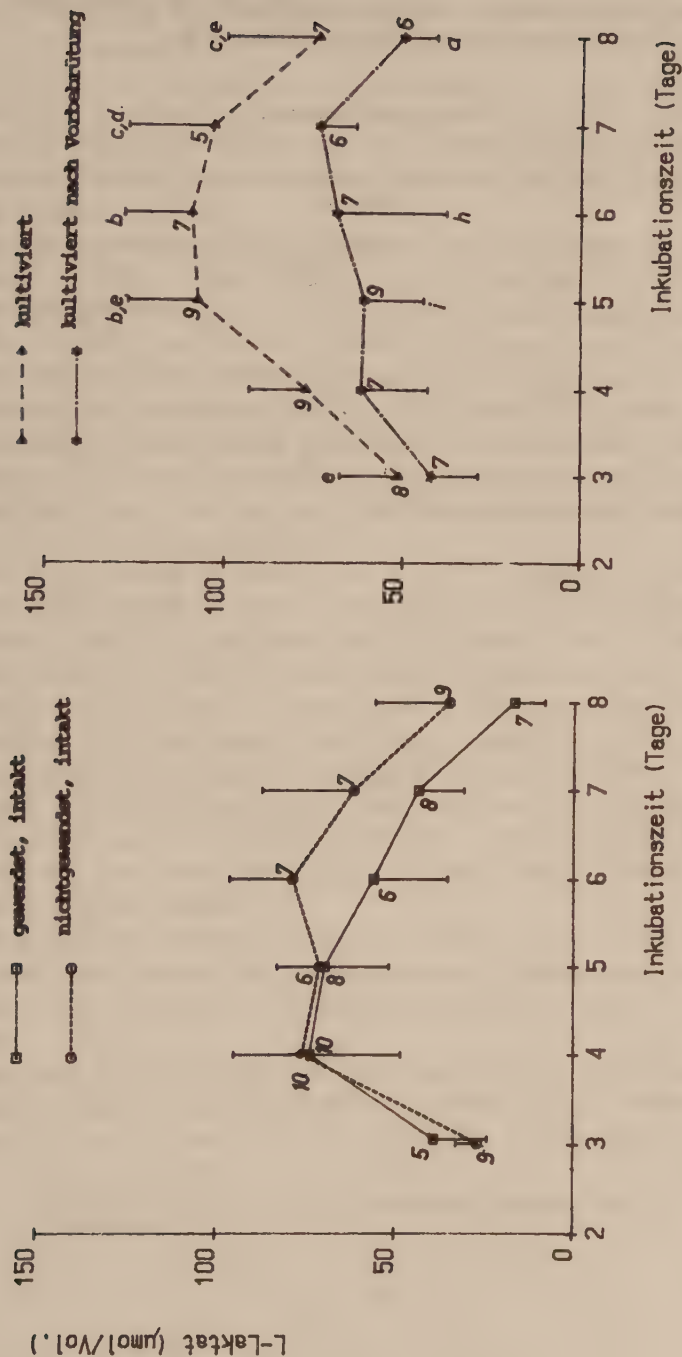


Abb. 9: Verlauf des L- Laktatgehaltes der subembryonalen Flüssigkeit

$ap < 0,05$ $bp < 0,01$ $Cp < 0,001$ i. V. mit der gewendeten intakten Gruppe
 $dp < 0,05$ $ep < 0,01$ i. V. mit der nichtgewendeten intakten Gruppe
 $hp < 0,01$ $ip < 0,001$ i. V. mit der kultivierten Gruppe

Tab. 8: L- Laktat ($\mu\text{mol/ml}$) in der subembryonalen Flüssigkeit zu verschiedenen Perforationszeitpunkten

Perforation	Inkubationstag		
	3	4	5
	$\mu\text{mol/ml}$		
ohne	$38,90 \pm 12,09$ (8)	$36,48 \pm 6,29$ (9)	$43,52 \pm 8,88$ (11)
Tag 4	-	-	$42,62 \pm 8,24$ (9)
Tag 3	$32,18 \pm 5,41$ (9)	$33,62 \pm 10,87$ (9)	$39,70 \pm 12,16$ (5)
Tag 2	$31,70 \pm 6,23$ (11)	$40,58 \pm 5,86$ (8)	$39,93 \pm 4,33$ (6)

2.3. Transfer von $^{42}\text{K}^+$ aus dem Eiklar in die subembryonale Flüssigkeit

Nachdem der oben angeführte Vorversuch (Tab. 7) zeigte, daß $^{42}\text{K}^+$ aus dem Eiklar in das subembryonale Kompartiment transportiert wird, sollte dieser Vorgang eingehender untersucht werden.

Da die subembryonale Flüssigkeit sich etwa nach 3 Bebrütungstagen bildet, wurde $^{42}\text{K}^+$ nach 48 Stunden in das Eiklar appliziert und alle 3 Stunden eine Probe entnommen. Abbildung 10a zeigt, daß innerhalb von 12 Stunden nur ein kleiner Anteil der applizierten Aktivität angereichert wurde, wohingegen im weiteren Verlauf des Versuchs ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war. Wurden die absoluten Transportraten (T_0) auf das Volumen der subembryonalen Flüssigkeit bezogen (T_1), so verlief die Kurve annähernd linear zur Inkubationsdauer (Abb. 10b).

In biologischen Systemen wird die K^+ - Aufnahme oft durch die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase reguliert. Deshalb wurde in einem weiteren Experiment die Transportrate (T_0) unter dem Einfluß von Ouabain untersucht. Ouabain hemmt bekanntlich die Aktivität der ATPase. In diesem Versuch wurden kultivierte Eier eingesetzt, die eine genau definierte Applikation in die subembryonale Flüssigkeit ermöglichen. Ouabain wurde in einer Dosis von 400ng pro Ei¹ verabreicht und der Untersuchungszeitraum auf 24 Stunden festgelegt. Aus Tabelle 9 geht hervor, daß unter dem Einfluß dieser Substanz weniger $^{42}\text{K}^+$ transportiert wurde.

Parallel dazu wurde auch der D- Glucose- und L- Laktatgehalt sowie das Volumen der subembryonalen Flüssigkeit bestimmt, die sich aber unter dem Einfluß von Ouabain nicht veränderten.

Nachdem die Anreicherung von Flüssigkeit in der subembryonalen Schicht in nichtgewendeten, intakten Eiern verzögert war, sollte geprüft werden, ob dies auch für den Kaliumtransport

1) Diese Dosis führte nach 48 Stunden zum Absterben der Embryonen.

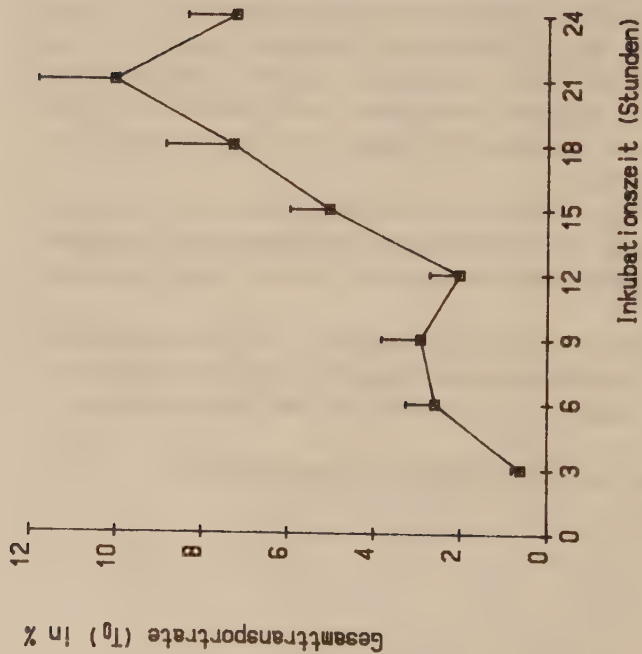


Abb. 10a: Transportrate (T_0) von 42°K° .

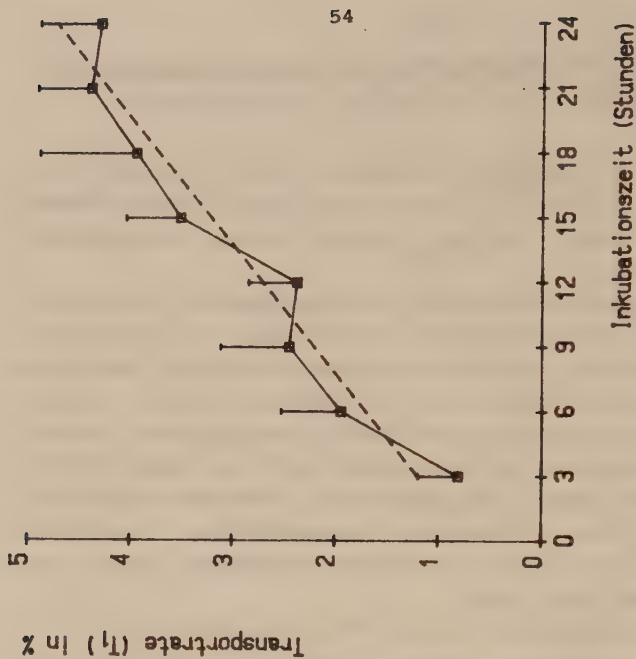


Abb. 10b: Transportrate (T_1) von 42°K° .

Die eingezeichnete gestrichelte Linie stellt die berechnete Regressionsgerade dar ($y=0,70+0,17 \cdot x$, $r^2=0,94$).

zutrifft. Zu diesem Zweck wurde der $^{42}\text{K}^+$ -Transport in nichtgewendeten und gewendeten, intakten Eiern miteinander verglichen. Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, sind die Transportraten (T_0) nach vier Bebrütungstagen höher als nach drei Inkubationstagen. Fehlendes Wenden führte lediglich nach 72 Bebrütungsstunden zu einer verringerten Transportrate.

Tab. 9: Der Einfluß von Ouabain auf die Transportrate (T_0) von $^{42}\text{K}^+$, den D- Glucosegehalt, den L- Laktatgehalt, sowie das Volumen der subembryonalen Flüssigkeit.

	T_0	Glucose	Lactat	Volumen
	%	μmol	μmol	ml
-	$7,47 \pm 1,74$ (6)	$10,38 \pm 1,76$ (9)	$33,14 \pm 3,79$ (9)	$1,39 \pm 0,19$ (9)
mit Ouabain	$4,06 \pm 1,03^*$ (6)	$10,16 \pm 1,44$ (9)	$28,58 \pm 1,34$ (9)	$1,13 \pm 0,06$ (9)

* $p < 0,05$

Ouabain und $^{42}\text{K}^+$ wurden nach 72 Inkubationsstunden appliziert. Gemessen wurde nach insgesamt 96 Inkubationsstunden.

Tab. 10: Transportraten (T_0) gewendeter und nichtgewendeter intakter Eier

	Inkubationstag	
	3	4
	% T_0	
gewendet	$7,27 \pm 1,14$ (6)	$11,30 \pm 1,70$ (6)
nichtgewendet	$5,71 \pm 1,58^*$ (6)	$10,90 \pm 1,90$ (6)

* $p < 0,05$

$^{42}\text{K}^+$ wurde nach 2 bzw. 3 Inkubationstagen appliziert und jeweils 24 Stunden später erfolgte die Probenentnahme aus der subembryonalen Flüssigkeit.

C. EMBRYONALES WACHSTUM

Es ist bekannt, daß kultivierte Embryonen schlechter wachsen als in ovo bebrütete. Dies wurde bisher auf der Grundlage des embryonalen Feuchtgewichtes ermittelt. Es stellte sich daher die Frage, ob sich die in dieser Arbeit vorgestellte Art des Kultivierens ebenso auf das embryonale Wachstum auswirkt. Zur Charakterisierung des Wachstums wurden außer dem Feuchtgewicht auch noch der DNS- und Proteingehalt bestimmt.

1. Darstellung der embryonalen Gewichtsentwicklung unter Berücksichtigung des DNS- und Proteingehalts

Die Feuchtgewichte der Embryonen sind in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigte sich, daß das Gewicht der Embryonen in den kultivierten Gruppen kleiner ist als das der Embryonen intakter Eier. Die Embryonen gewendeter, intakter Eier erreichten an den Tagen 3, 4, 7 und 8 höhere Werte als die Embryonen nichtgewendeter, intakter Eier. Innerhalb der kultivierten Gruppen gab es keine Unterschiede.

Ein ähnlicher Verlauf war auch beim DNS- Gehalt (Abb. 12) gegeben, wobei die Embryonen intakter Eier einen höheren DNS-Gehalt aufwiesen, als die Embryonen kultivierter Eier. Die Embryonen gewendeter Eier erreichten zudem nach 7 bzw. 8 Inkubationstagen statistisch signifikant höhere Werte als die nichtgewendeter intakter Eier.

Den niedrigsten DNS-Gehalt zeigten die kultivierten Embryonen. Beide Gruppen waren von der gewendeten Gruppe signifikant verschieden und teilweise auch von der nichtgewendeten Gruppe.

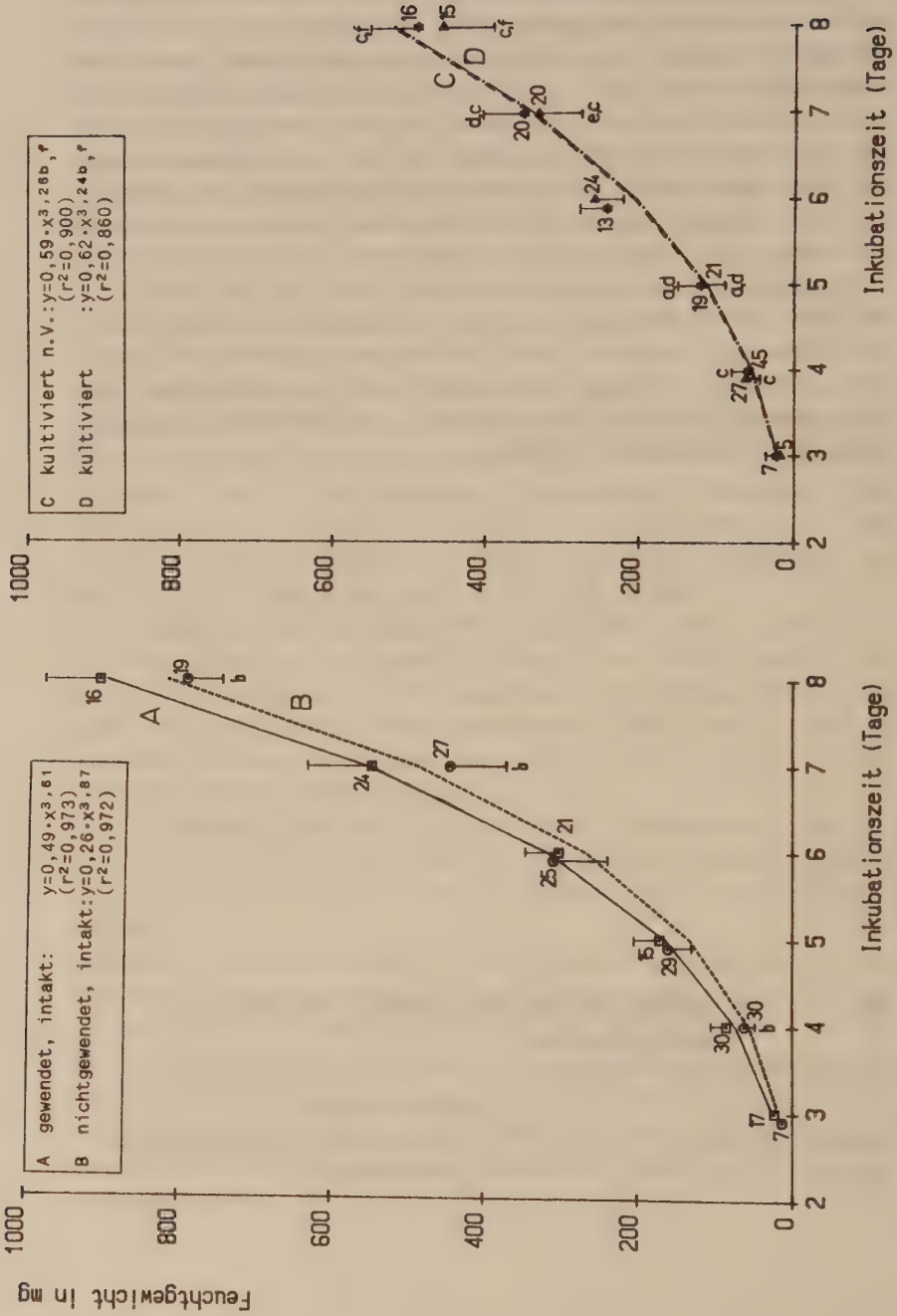
Schließlich unterschieden sich die Embryonen intakter von den Embryonen kultivierter Eier auch im Proteingehalt (Abb. 13). Im Vergleich zum Feuchtgewicht und zur DNS fällt auf, daß die intakten Eier in ihren Werten nahezu übereinstimmen. Die kultivierten Embryonen nahmen dagegen mit Ausnahme von Tag 3 geringere Proteinwerte ein, wobei an Tag 5, 7 und 8 die Unterschiede zu den in ovo bebrüteten Embryonen besonders deutlich waren.

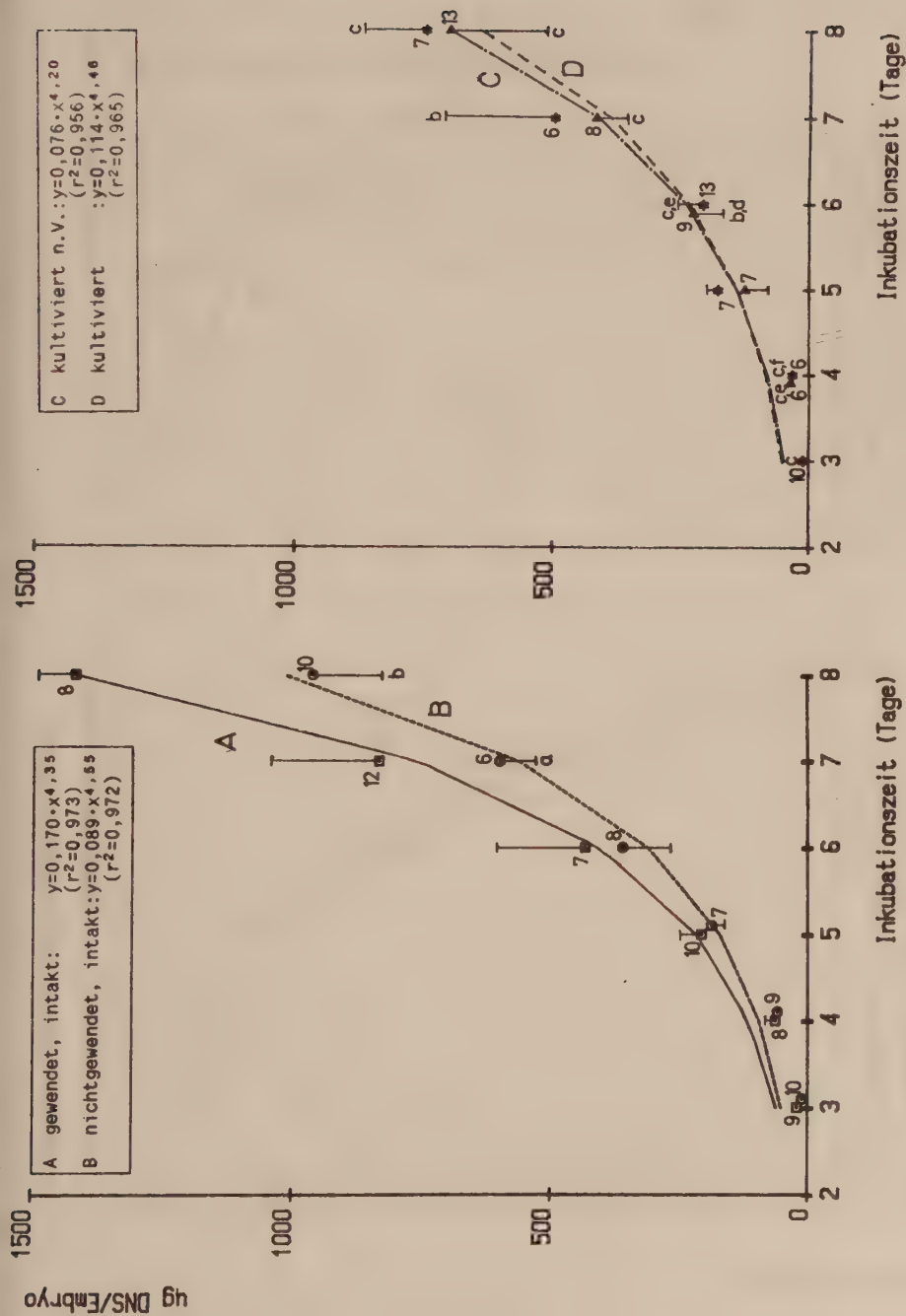
Nachdem die drei Parameter durch die Meßwerte festgelegt waren, wurde versucht, ob sich die Werte an die im Methodenteil (2.4.) beschriebene Gleichung anpassen lassen. Dies war für alle Gruppen der Fall. In den Abbildungen sind die errechneten Werte zu einer Kurve verbunden, während die experimentell ermittelten Werte isoliert dargestellt sind. Aus den Abbildungen geht hervor, daß die errechneten Kurven mit den experimentellen Ergebnissen weitgehend zur Deckung gebracht werden können. Die Abbildungen enthalten außerdem die jeweiligen Gleichungen mit den Werten für die Konstanten a und b .

Wie aus den Gleichungen hervorgeht, ist die Konstante b bei den Embryonen intakter Eier statistisch signifikant größer als bei den Embryonen kultivierter Eier. Beim DNS- und Proteingehalt konnten Unterschiede in der Konstante b statistisch nicht gesichert werden.

Abb. 11- 13: Verlauf des Feuchtgewichtes, des DNS- und Proteingehaltes

$a_{p<0,05}$	$b_{p<0,01}$	$c_{p<0,001}$	i. V. mit der gewendeten, intakten Gruppe
$d_{p<0,05}$	$e_{p<0,01}$	$f_{p<0,001}$	i. V. mit der nichtgewendeten, intakten Gruppe





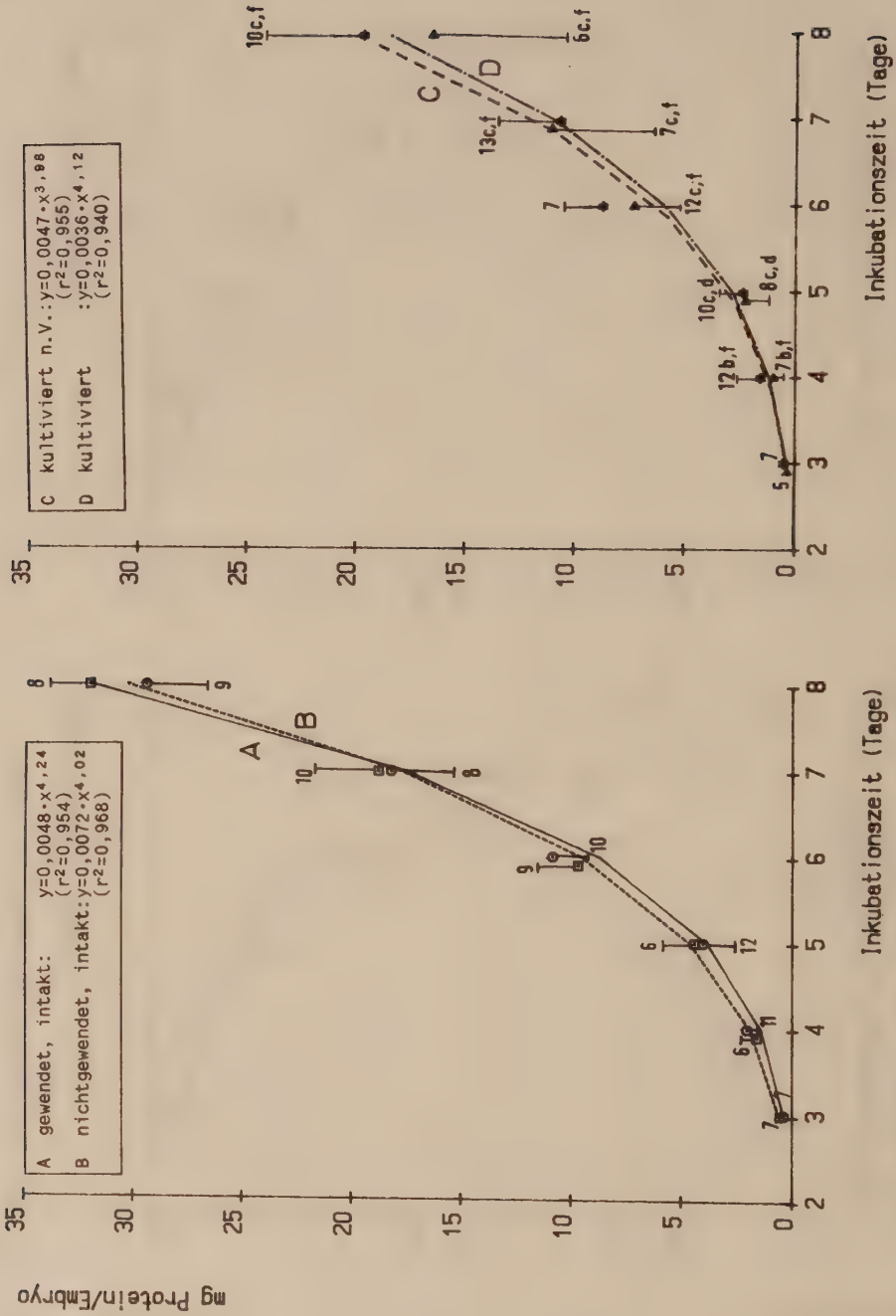


Abb. 13: Verlauf des Proteingehaltes.

Im folgenden wurde die DNS- und die Proteinsynthese näher charakterisiert.

2. Markierung der Kern-DNS mit 6[-³H]Thymin

In Abbildung 14 ist der Verlauf der DNS- Markierung im Untersuchungszeitraum dargestellt. Auffallend ist, daß die kultivierten Embryonen im allgemeinen höhere Werte aufwiesen als die Embryonen intakter Eier. Weiter ist aus der Abbildung ersichtlich, daß die Markierung der DNS bis zum Tag 8 abnimmt.

In einem weiteren Versuch wurde die sog. Anflutung von [³H]-dT bestimmt (Abb. 15). Es wurde dabei die gesamte Aufnahme der radioaktiven Substanz gemessen und auf 100 mg embryonales Feuchtgewicht bezogen. Der Versuch wurde an den Bebrütungstagen 3, 4, 6 und 8 durchgeführt. Die Anflutung nahm in beiden Gruppen kontinuierlich ab, wobei die Anflutung der kultivierten Embryonen bis auf Tag 4 statistisch signifikant höher war.

Die obigen Ergebnisse zeigen einen unterschiedlichen Einbau des [³H]-dT auf, der möglicherweise durch eine unterschiedliche Anflutung bedingt ist. Im weiteren wurde deshalb untersucht, ob ein von der Anflutung unabhängiger Faktor am Unterschied im [³H]-dT- Einbau in die DNS beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurde der Einbau in Becquerel, der sich in der DNS- Menge vollzieht, die in 100mg Feuchtgewicht enthalten ist, berechnet. Teilt man diesen Wert durch den entsprechenden Wert der Anflutung, der ebenso auf 100mg Feuchtgewicht bezogen ist, so erhält man den Anteil der Anflutung, der in die DNS eingebaut wurde. Dieser Anteil wird in Prozent ausgedrückt. Die auf diese Weise erhaltenen Werte sind in Abbildung 16 dargestellt.

Es ist zu ersehen, daß am Tag 3 und 4 der Einbau von [³H]-dT in den Embryonen der intakten Eier einen statistisch signifikant höheren prozentualen Anteil der Anflutung einnimmt als der in den kultivierten Embryonen. Hingegen waren die Werte der kultivierten Embryonen am Tag 6 höher als die der Embryonen intakter Eier. Beide Gruppen erreichten schließlich

am Tag 8 die kleinsten Werte während des gesamten Untersuchungszeitraums.

3. Einbau von L-Glutaminsäure in das embryonale Protein

Um den Einbau von L-Glutaminsäure in das Protein zu bestimmen, wurde zunächst die freie L-Glutaminsäure im Überstand des Homogenates bestimmt (siehe Methodenteil 2.3.9.) und die spezifische Aktivität (Bq/nmol L-Glutamat) ermittelt. Daraus konnte die L-Glutaminsäure in nmol berechnet werden, die in 20 Stunden in das Protein eingebaut wurde. Aus der Tabelle 11 geht hervor, daß bei den intakten Eiern der Einbau von L-Glutaminsäure von Tag 3 bis Tag 6 kontinuierlich abnimmt. Bei den kultivierten Embryonen war zunächst eine Zunahme zu beobachten, ab Inkubationstag 5 fielen die Werte ab. Insgesamt konnten im Vergleich zwischen den Gruppen nur in Ausnahmefällen Unterschiede statistisch gesichert werden.

Aus dem Verlauf der Proteinsynthese ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen, andererseits wurde jedoch ein unterschiedliches Wachstum zwischen den intakten und kultivierten Embryonen aufgezeigt. Da ein unterschiedliches Wachstum auch einen unterschiedlichen Aminosäurenverbrauch erfordert, sollte die Frage geklärt werden, ob nicht möglicherweise ein unterschiedliches Angebot an freien Aminosäuren in der subembryonalen Flüssigkeit vorliegt.

Zu diesem Zweck wurde der Aminosäuregehalt der subembryonalen Flüssigkeit in nichtgewendeten intakten und den von Tag 0 an kultivierten Eiern bestimmt. Es konnten 19 Aminosäuren identifiziert und überwiegend quantitativ ausgewertet werden. Aus Tabelle 12 ist ersichtlich, daß in beiden Gruppen die gemessenen Aminosäuren mit Ausnahme des Glycins und Ornithins in ihrem Gesamtgehalt zwischen Tag 3 und 6 zunahmen. Besonders drastisch stellte sich die Steigerung bei Asparagin- und Glutaminsäure dar.

Am Inkubationstag 3 wies die kultivierte Gruppe bis auf Threonin und Serin keine statistisch signifikanten Unter-

schiede zu den nichtgewendeten, intakten Eiern auf. Dies war am Tag 6 nicht mehr der Fall; bis auf Glycin und Ornithin lagen bei den kultivierten Eiern alle Aminosäuren in ihren Werten niedriger.

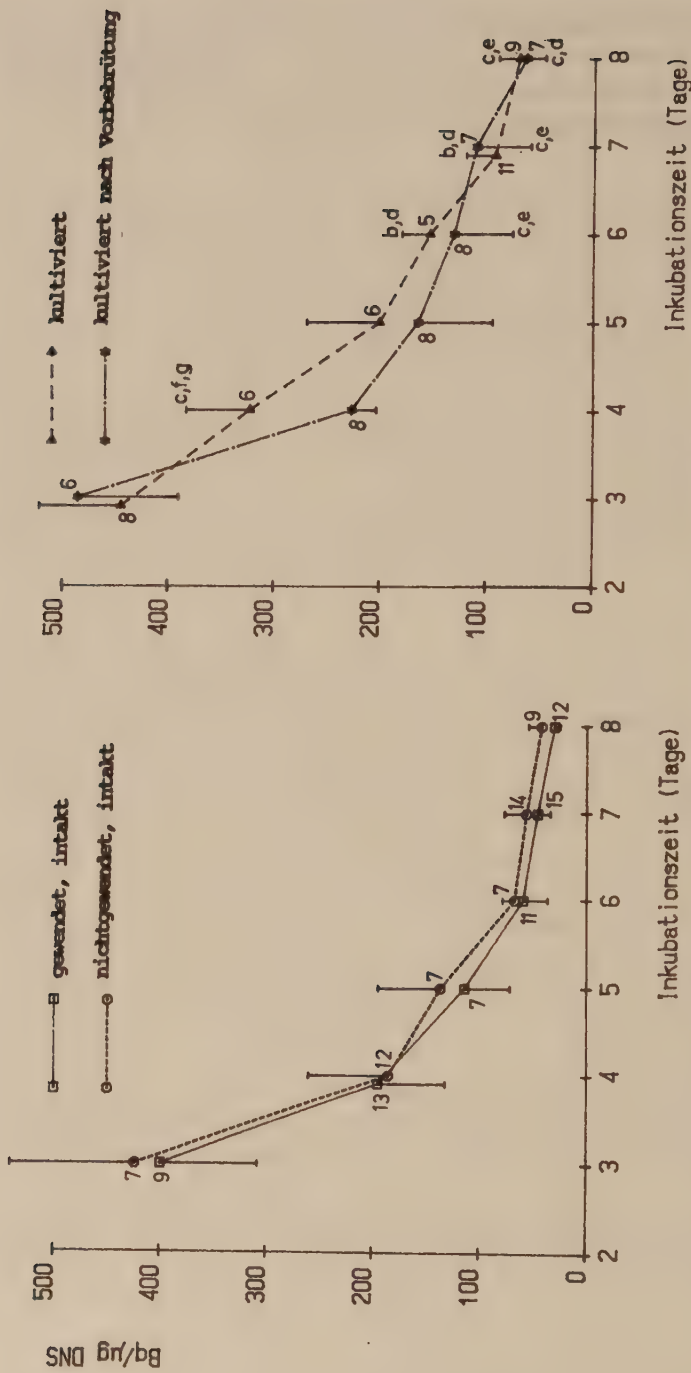


Abb. 14: Verlauf des Einbaus von 6[3-H]thymidin in die Kern- DNS.

ap<0,05	bp<0,01	cp<0,001	i. V. mit der gewendeten intakten Gruppe
dp<0,05	ep<0,01	fp<0,001	i. V. mit der nichtgewendeten intakten Gruppe
gp<0,05			i. V. mit der kultivierten Gruppe

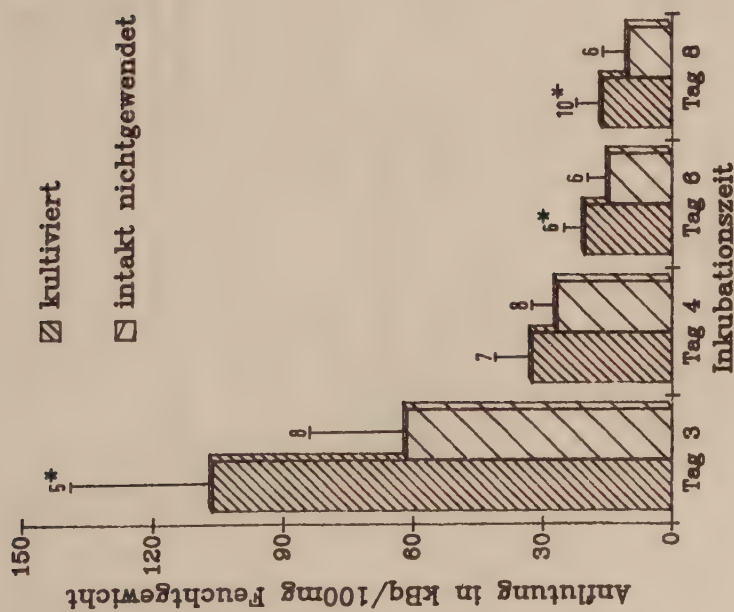


Abb. 15: Anflutung von 6[3-H]thymidin.

*p<0,05

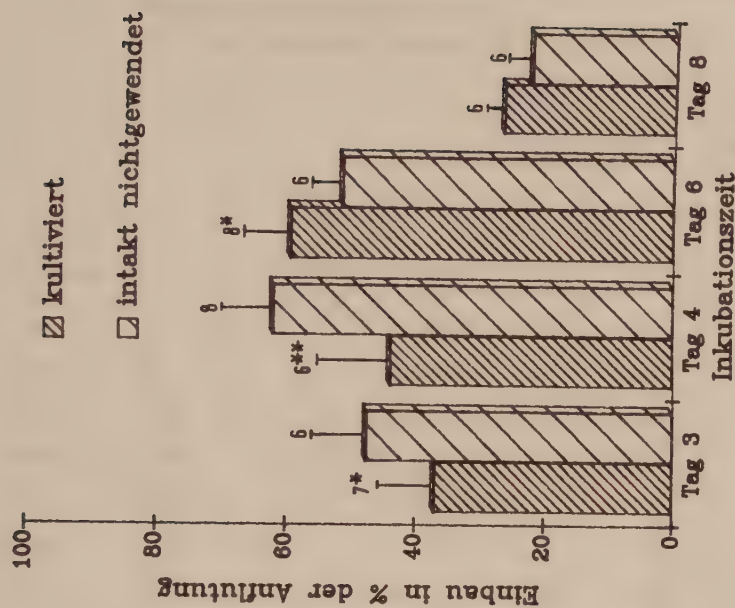


Abb. 16: Prozentualer Anteil des Einbaus an der Anflutung

*p<0,05 **p<0,01

Tab. 11: Einbau von L-Glutaminsäure in embryonales Protein.

	Inkubationszeit (Tage)			
	3	4	5	6
	nmol/mg Protein			
gewendet, intakt	355,3±75,6 (6)	272,4±68,0 (6)	229,3±45,3 (6)	202,0±77,1 (9)
nichtgewendet, intakt	403,2±30,9 (8)	293,0±68,3 (8)	223,4±35,5 (12)	214,1±64,9 (16)
kultiviert	453,3±166,4 (5)	545,0±196,6 ^b (9)	309,7±205,4 (8)	237,7±63,7 (8)
kultiviert nach Vorb.	350,1±138,5 (7)	435,3±113,3 (12)	400,0±153,0 ^d (10)	234,6±103,4 (7)

b_p<0,01

i.V. mit der gewendeten, intakten Gruppe

d_p<0,05

i.V. mit der nichtgewendeten, intakten Gruppe

Tab. 12: Gesamtmenge (nmol/Vol.) freier Aminosäuren in der subembryonalen Flüssigkeit.

(B = nichtgewendet, intakt D = kultiviert)

		Inkubationszeit (Tage)	
		3	6
		nmol/Volumen	
Phosphoserin	B	n.b.	180,0 ± 46,7 (6)
	D	n.b.	92,3 ± 38,2** (7)
Taurin	B	n.b.	1112,0 ± 202,9 (6)
	D	n.b.	553,3 ± 253,8** (7)
Asparaginsäure	B	196,3 ± 87,4 (6)	2397,2 ± 556,3 (6)
	D	172,9 ± 130,9 (6)	1555,5 ± 564,5* (8)
Threonin	B	904,9 ± 212,8 (6)	4295,5 ± 967,4 (6)
	D	698,2 ± 124,1* (10)	2881,3 ± 953,6*** (8)
Serin	B	1195,4 ± 242,5 (6)	5954,1 ± 1427,5 (6)
	D	900,9 ± 189,5* (10)	3551,6 ± 1160,3* (8)
Asparagin	B	n.b.	n.b.
	D	n.b.	n.b.
Glutaminsäure	B	499,6 ± 214,4 (6)	7875,1 ± 1639,3 (6)
	D	502,7 ± 334,7 (10)	5474,0 ± 1956,6* (8)
Glutamin	B	1708,4 ± 333,2 (6)	6824,9 ± 1782,8 (6)
	D	1555,7 ± 340,2 (10)	3889,2 ± 1278,8** (8)
Glycin	B	784,2 ± 131,9 (6)	1264,2 ± 472,8 (6)
	D	762,8 ± 109,3 (10)	1210,4 ± 572,0 (8)
Alanin	B	1411,6 ± 271,9 (6)	4850,7 ± 913,1 (6)
	D	1210,1 ± 190,0 (10)	3168,8 ± 761,7** (8)

n.b. = nicht berechnet

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Tab. 12: (Fortsetzung)

		Inkubationszeit (Tage)	
		3	6
Valin	B	1461,8 ± 265,6 (6)	5170,0 ± 1054,4 (6)
	D	1248,5 ± 186,0 (10)	3287,4 ± 652,1** (8)
Methionin	B	440,2 ± 129,8 (6)	1539,1 ± 223,2 (6)
	D	410,6 ± 70,8 (10)	865,3 ± 240,2*** (8)
Isoleucin	B	1159,4 ± 283,8 (6)	3982,7 ± 686,0 (6)
	D	987,1 ± 251,8 (10)	2303,5 ± 571,0*** (8)
Leucin	B	2377,3 ± 558,1 (6)	6324,6 ± 1224,7 (6)
	D	2238,7 ± 397,9 (10)	4171,9 ± 1258,2** (8)
Tyrosin	B	724,4 ± 111,1 (6)	3283,7 ± 761,7 (8)
	D	660,2 ± 88,2 (10)	2069,0 ± 456,7*** (8)
Phenylalanin	B	850,5 ± 206,6 (6)	2790,0 ± 569,9 (6)
	D	785,2 ± 111,2 (10)	1842,1 ± 461,6** (8)
Ornithin	B	108,1 ± 17,7 (6)	121,9 ± 43,6 (6)
	D	131,4 ± 34,7 (10)	158,8 ± 49,0 (8)
Lysin	B	701,1 ± 165,6 (6)	3808,7 ± 843,0 (6)
	D	812,8 ± 134,3 (10)	2591,0 ± 714,3* (8)
Histidin	B	251,8 ± 41,9 (6)	1049,3 ± 273,8 (6)
	D	229,7 ± 39,4 (10)	408,0 ± 151,6*** (8)
Arginin	B	612,9 ± 191,8 (3)	4125,7 ± 780,6 (4)
	D	518,6 ± 84,8 (4)	2433,9 ± 663,6** (5)

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

D. Ausscheidung in die Allantoisflüssigkeit

In einem abschließenden Kapitel wurde der Einfluß des Wendens und der Kultivierung auf die Ausscheidungsprozesse in die Allantois untersucht. Dabei wurden mit der Harnsäure und den Nukleosiden Verbindungen gewählt, die mit dem DNS- und Proteinstoffwechsel verbunden sind.

Die beherrschende Fraktion in der Allantoisflüssigkeit ist die Harnsäure. Wie aus Abbildung 17b hervorgeht, nahm in allen Gruppen die Harnsäureausscheidung zu, wobei der Anstieg in der gewendeten Gruppe besonders ausgeprägt war. Auffällig war das niedrige Niveau auf dem sich die Harnsäureausscheidung in den kultivierten Gruppen bewegte.

Bei den übrigen gemessenen Verbindungen (Abb. 18b) fiel auf, daß nur noch in der Ausscheidung methylierter Purinnukleoside Unterschiede vorhanden waren. Die gewendeten, intakten Eier lagen dabei signifikant höher als die übrigen Gruppen.

Da sich die intakten und die kultivierten Eier im Volumen der Allantois deutlich unterschieden (Tab. 5), wurden zudem die Konzentrationen (nmol/ml Allantoisflüssigkeit) bestimmt. Aus den Abbildungen 17a und 18a geht hervor, daß die Unterschiede bei der Harnsäure und teilweise bei den methylierten Produkten bestehen blieben.

In einem weiteren Versuch war es von Interesse, ob im weiteren Verlauf der Inkubation die methylierten Purinnukleoside ansteigen. Wie Abbildung 19 zeigt nahmen die ausgeschiedenen Mengen der methylierten Verbindungen zwischen Tag 8 und 10 drastisch zu.

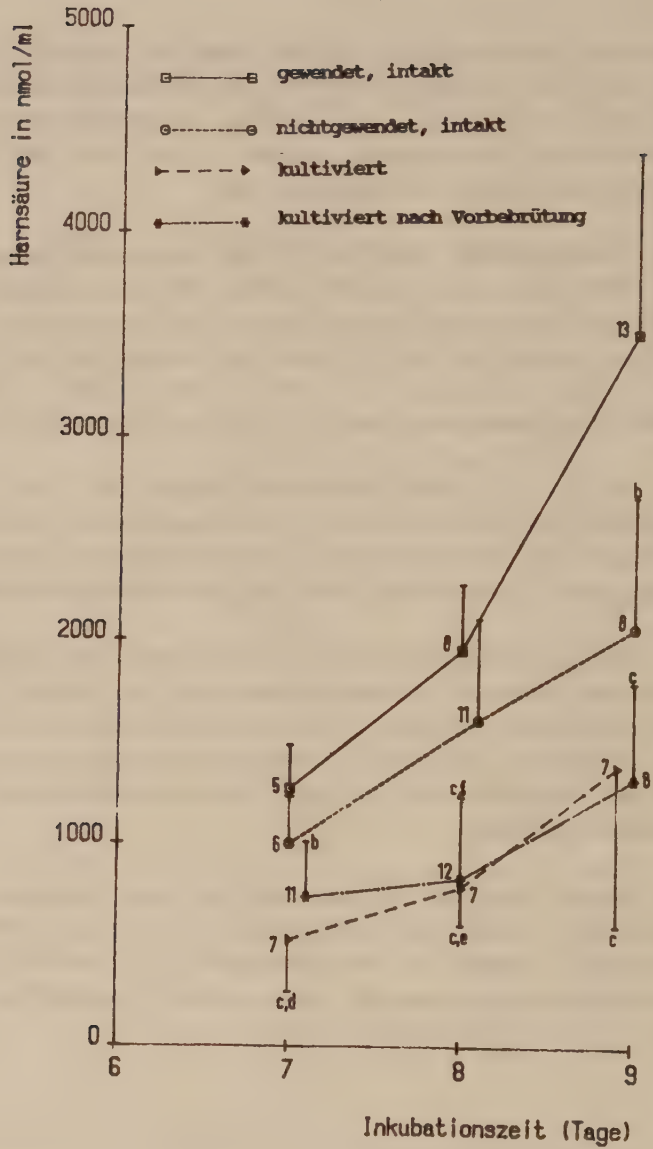


Abb. 17a: Harnsäureausscheidung in nmol/ml Allantoisflüssigkeit

^b $p < 0,01$
^d $p < 0,05$

^c $p < 0,001$
^e $p < 0,01$

^f $p < 0,001$

i. V. mit der gewendeten intakten Gruppe

i. V. mit der nichtgewendeten intakten Gruppe

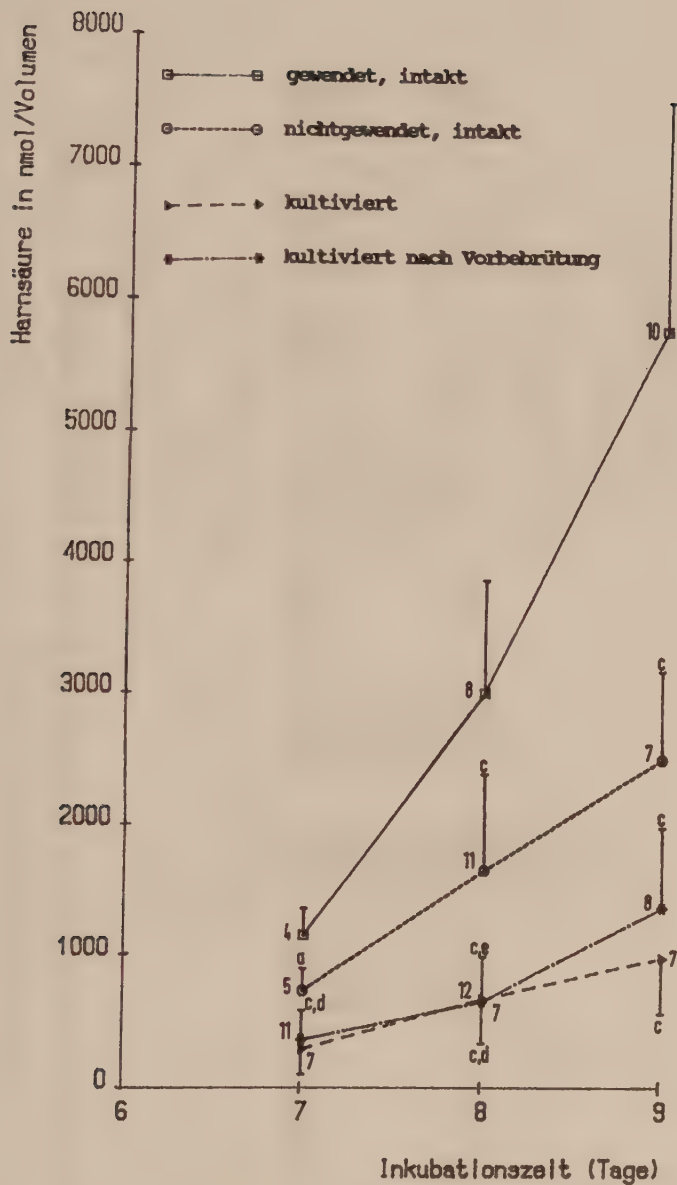


Abb. 17b: Gesamtausscheidung der Harnsäure

$a_{p < 0,05}$ $c_{p < 0,001}$ i. V. mit der gewendeten intakten Gruppe
 $d_{p < 0,05}$ $e_{p < 0,01}$ i. V. mit der nichtgewendeten intakten Gruppe

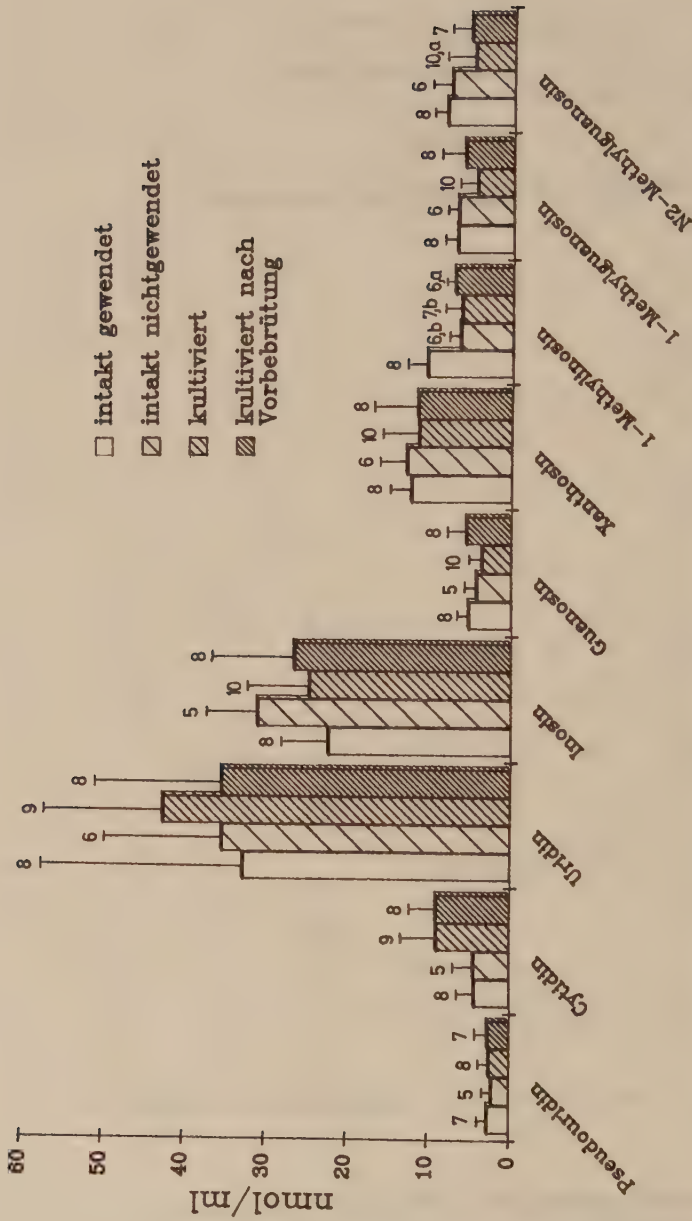


Abb. 13a: Ausscheidung von Nukleosiden und methylierten Nukleosiden in nmol/ml

Allantoisflüssigkeit am Tag 8

$a_p < 0,05$ $b_p < 0,01$ i. V. mit der gewendeten intakten Gruppe

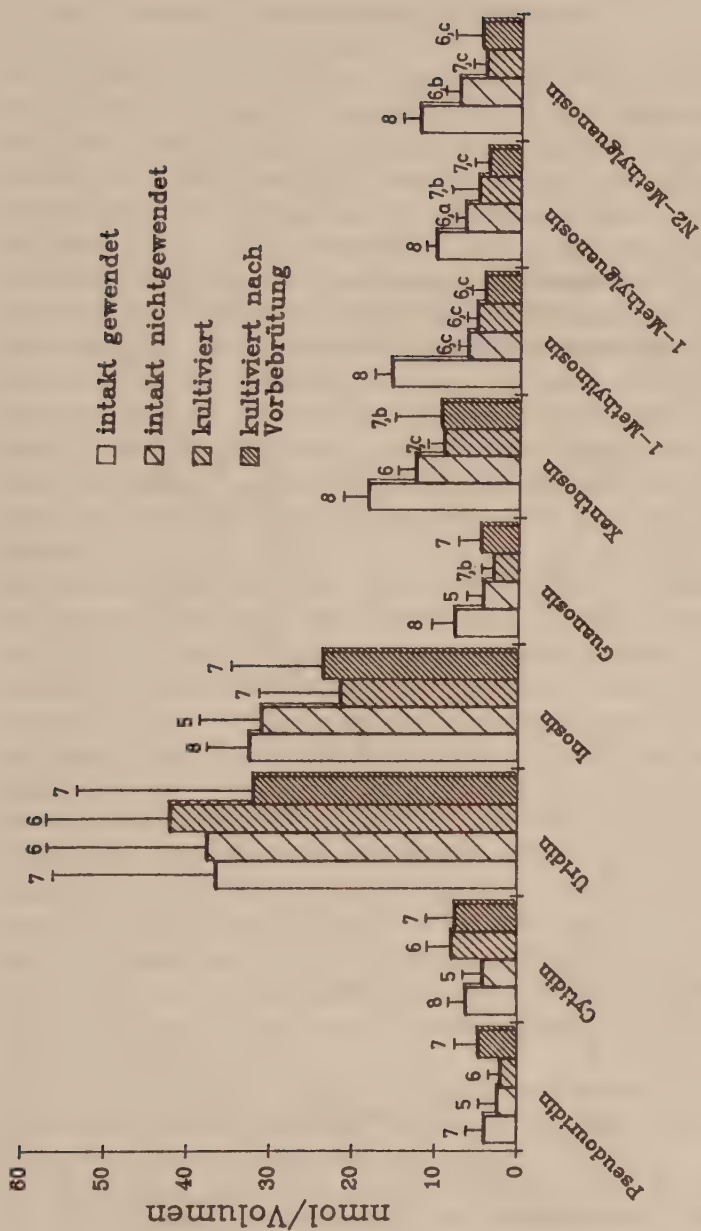


Abb. 18b: Gesamtausscheidung von Nukleosiden und methylierten Nukleosiden am Tag 8

$a_p < 0,05$ $b_p < 0,01$ $c_p < 0,001$ i. V. mit der gewendeten, intakten Gruppe

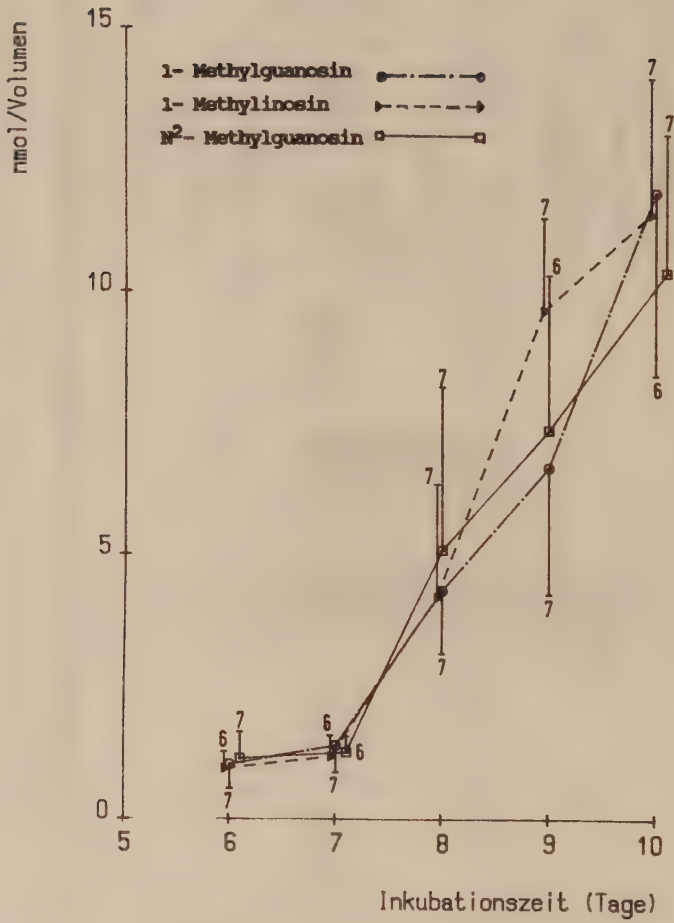


Abb. 19: Ausscheidung von methylierten Nukleosiden

IV. DISKUSSION

1. Kultivierung: Induktion der Embryogenese

Das Blastoderm wird in ovo von den Schalenmembranen vor dem Austrocknen geschützt. Damit die Embryonalentwicklung unter in vitro Bedingungen einsetzt, muß die besondere Funktion dieser Membranen beachtet werden. KUTCHAI und STEEN (1971) legten dar, daß die O_2 - und CO_2 -Austauschkapazität in frisch gelegten Eiern vergleichsweise niedrig ist und nach 3 - 5 Inkubationstagen zunimmt. Für diese Zunahme im Gasaustausch scheint der abnehmende Wassergehalt der Schalenmembranen besonders der der inneren verantwortlich zu sein. KUTCHAI und STEEN (1971) sowie TULLET und BOARD (1976) nehmen an, daß mit fortschreitender Inkubationszeit das Wasser in den Poren durch Luft ersetzt wird, die den Gasaustausch erleichtert. Dies bedeutet, daß unter Normalbedingungen eine feuchte Membran das Blastoderm bedeckt und es so vor dem Austrocknen bewahrt.

Bei der Kultivierung ist dies nicht mehr der Fall, da die Schalenmembranen entfernt werden. Die in der Literatur als erfolgreich beschriebenen Kultivierungsverfahren begannen erst nach einer Vorbebrütung der Eier von i.d.R. 72 Stunden. Versuche, vom Tag 0 an zu kultivieren führten zu äußerst geringen Überlebensraten. Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ist zu vermuten, daß in diesen Fällen der Wasserverlust in den ersten Tagen zu hoch war. Dies wird zudem noch unterstützt durch Angaben in der Literatur, in denen z.T. Folien gewählt wurden, die in ihrer Wasseraustauschrate weitaus höher lagen als die Folie, die hier verwendet wurde (BOONE 1963, DUNN 1980). Der Wasserverlust in diesen Systemen war somit unkontrollierbar, und die Blastoderme zeigten deutliche Dehydratationserscheinungen (BOONE 1963).

Mit der in dieser Arbeit eingesetzten Membran wurde das Blastoderm feucht gehalten und somit die Bedingungen weitgehend in ovo-Verhältnissen angepaßt.

Mit der Folie wurde allerdings auch der Gasaustausch beein-

trächtig. In den ersten Tagen ist dies nicht von Nachteil, da das System ein entsprechend hohes Gasvolumen aufweist, um einerseits den O_2 - Bedarf des Embryos zu decken und zum andern das entstehende CO_2 zu verdünnen. Mit zunehmendem Wachstum des Embryos wird jedoch der durch die Folie limitierte Gasaustausch kritisch. Wie Abbildung 3 zeigt, ist ein steiler Abfall von O_2 und Anstieg von CO_2 zu beachten. Dem wurde durch die Perforation der Folie am Tag 3 entgegengewirkt.

Trotz Perforation kam es zu einem leichten Anstieg des CO_2 bzw. Abfall des O_2 . Bei der Beurteilung dieses Befundes ist zu bedenken, daß unter normalen Bedingungen die CAM- Gefäße im Laufe der Inkubation O_2 - Konzentrationen ausgesetzt sind, die ebenfalls unter 20% liegen. Dies ist durch die limitierende Gasaustauschkapazität der Eischale bedingt. Weiterhin ist aus verschiedenen Untersuchungen (DUNN 1974, ONO und WAKASUGI 1984) bekannt, daß eine zusätzliche Begasung mit CO_2 sogar die Überlebensrate steigert. Daraus kann entnommen werden, daß von einem Anstieg der CO_2 - Konzentration, wie er im vorgestellten System beobachtet wurde, keine nachteiligen Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen ausgehen.

Mit der Perforation der Folie wird auch die Wasserabgabe gesteigert; dabei wird ein Wasserverlust des kultivierten Eies erreicht, der den natürlichen Gegebenheiten entspricht (Tab. 4). Dies ist insofern von Bedeutung, da eine optimale Wasserverlustrate für eine erfolgreiche Bebrütung entscheidend ist (AR und RAHN 1980). Ist dies nicht der Fall, so können Störungen im Wasserhaushalt das osmotische Geschehen beeinflussen und zum Absterben des Embryos führen. Es wäre noch anzumerken, daß zum Zeitpunkt der Perforation die Gefahr des Austrocknens nicht mehr gegeben ist, da sich die Amnionfalten soweit entwickelt haben, daß eine Dehydratation des Embryos verhindert wird.

2. Der Einfluß der Kultivierung und des Wendens auf die Bildung und Zusammensetzung der subembryonalen Flüssigkeit

Im Laufe der ersten Inkubationswoche wird fast ein Drittel des gesamten Eiinhaltes in der subembryonalen Flüssigkeit angereichert. Zu diesem Zeitpunkt besteht diese Flüssigkeit zu 90% aus Wasser (ROMANOFF, 1967), das vom Eiklar einströmt. Die Verschiebung einer derart großen Flüssigkeitsmenge kann am Gewichtsverlust des Eiklars verfolgt werden. Aus Abbildung 5, die den Verlauf des Gewichtsverlustes im Eiklar zeigt, ist bei den gewendeten, intakten Eiern eine deutliche Abnahme von Tag 2 zu Tag 3 zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt war tatsächlich eine meßbare Menge subembryonaler Flüssigkeit entstanden (Abb. 6). In den anderen Gruppen war bis zum Bebrütungstag 3 der Abfall im Eiklargewicht nicht so deutlich; es bildete sich auch eine geringere Menge an subembryonaler Flüssigkeit aus. Offensichtlich spiegelt zu diesem Zeitpunkt der Gewichtsverlust des Eiklars den Beginn der Bildung der subembryonalen Flüssigkeit wider.

In den gewendeten, intakten Eiern nahm im weiteren Verlauf das Gewicht des Eiklars ab, ohne daß die Volumenwerte der subembryonalen Flüssigkeit zunahmen. Daraus muß geschlossen werden, daß die Flüssigkeit in andere Eikompartimente, wie z.B. in Amnion und Allantois, transportiert wurde.

Die nichtgewendeten, intakten Eier zeigten im Gegensatz dazu zwischen Tag 3 und 6 einen Anstieg in den Volumenwerten der subembryonalen Flüssigkeit, obwohl der Verlauf des Gewichtsverlusts des Eiklars dem der gewendeten, intakten Eier ähnlich war. Das deutet darauf hin, daß das Wenden der Eier den Wasserausstrom aus dem Eiklar beschleunigt und zudem die Weiterverteilung der Flüssigkeit in andere Kompartimente begünstigt.

In den kultivierten Eiern war nach 24 bzw. 48 Stunden eine geringere Eiklarmenge als in den intakten vorhanden. Dies steht offensichtlich nicht mit einer vorzeitigen Bildung der subembryonalen Flüssigkeit in Verbindung, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Anreicherung der subembryonalen Flüssig-

keit zu beobachten war. Möglicherweise ist der Verlust des Eiklars beim Ansetzen der Eier zustandegekommen.

Bei den kultivierten Eiern war der Abfall des Eiklargewichtes verzögert, und zudem stieg das Volumen der subembryonalen Flüssigkeit bis zum Tag 6 an. Damit sind ähnliche Verhältnisse wie in den nichtgewendeten, intakten Eiern gegeben. Es ist daher die Annahme berechtigt, daß auch bei diesen beiden Gruppen das Unterlassen des Wendens den Wasserausstrom aus dem Eiklar und nachfolgend aus der subembryonalen Flüssigkeit beeinträchtigt. Da jedoch die kultivierten Eier einen geringeren Gewichtsverlust als die intakten Eier zeigten, ist die Vermutung naheliegend, daß auch der Kultivierungsprozeß einen hemmenden Einfluß auf die Wasserabgabe aus dem Eiklar bewirkt.

Eine mögliche Ursache für diesen Befund könnte darin bestehen, daß es bei der Kultivierung zu einer Störung des engen Kontakts zwischen Eiklar und Dotter kommt, indem das Eiklar bis auf eine dünne Schicht vom Dotter abfließt. Zudem ist zu bedenken, daß unter in vitro-Bedingungen das Umwachsen des Dotters durch die Dottersackmembran verzögert ist (DUNN 1981, ROWLETT and SIMKISS, 1986). Nach NEW (1956) ist die Membran, wie in der Einleitung erwähnt, für die Resorption der Flüssigkeit verantwortlich. Weiterhin wölbt sich im Ei das subembryonale Kompartiment "kuppelartig" über den Restdotter, während sich in der Kultur ein eher "tellerartiges" Kompartiment ausbildet. Die Kontaktfläche zwischen Eiklar und Dottersackmembran ist so vermindert, wodurch die Resorption der Flüssigkeit aus dem Eiklar beeinträchtigt sein könnte.

Wie bereits oben angemerkt, wirkt das Unterlassen des Wendens dem Weitertransport von Flüssigkeit auch aus dem subembryonalen Kompartiment entgegen. Davon sollten in erster Linie die Ausbildung der Amnion- und Allantoisflüssigkeit betroffen sein. Die Versuche zeigten dementsprechend auch eine verzögerte Ansammlung der Allantoisflüssigkeit bei den nichtgewendeten, intakten Eiern und besonders deutlich bei den kultivierten Eiern. Es ist freilich zu bemerken, daß die Allantoisflüssigkeit erst am 7. Tag gemessen werden konnte,

die Bildung der Allantois jedoch bereits vor diesem Zeitpunkt beginnt.

Insgesamt zeigen die Versuche, daß dem Wenden der Eier eine wichtige Aufgabe bei der Umverteilung des Wassers zukommt. Diese Vorstellung wird durch Literaturangaben unterstützt, denen zufolge sich ein Unterlassen des Wendens zwischen Tag 4 und 7 als besonders nachteilig für die Embryonalentwicklung auswirken soll (NEW 1956, DEEMING 1987). In dieser Periode vollziehen sich, den hier vorgestellten Ergebnissen folgend, die größten Flüssigkeitsbewegungen.

Über die Funktion des Wendens gibt es unterschiedliche Auffassungen. NEW (1956) erklärte die Bedeutung des Wendens damit, daß die dünne Eiklarschicht zwischen Chorion und Schalenmembran durch das Wenden in dieser Phase ersetzt wird und es damit zu keiner abnormalen Adhäsion zwischen Chorion und Schalenmembranen kommen kann. Andererseits wird die Meinung vertreten, daß das Wenden den Metabolismus des Eiklars fördert (RANGLES und ROMANOFF, 1950). TAZAWA (1980) vermutete, daß in nichtgewendeten Eiern die Allantois durch nicht resorbiertes Eiklar in ihrer respiratorischen Funktion behindert werde. Er fand jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Blutgase.

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, wird aus dem Eiklar in erster Linie Flüssigkeit transportiert. Jedoch ist bekannt, daß diesen Weg auch D- Glucose und anorganische Ionen nehmen. Dies konnte im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen bestätigt werden.

Offensichtlich wird D-Glucose dabei mit der Flüssigkeit transportiert und durch die für Glucose frei permeable Dottersackmembran (GARCIA 1983) in das subembryonale Kompartiment verbracht. Darauf deutet der parallele Verlauf der Abnahme der D- Glucose im Eiklar (Abb. 7) und der Abnahme des Eiklargewichtes (Abb. 5) hin.

Vergleicht man den Verlauf des D- Glucosegehaltes im Eiklar mit dem in der subembryonalen Flüssigkeit, so fällt auf, daß der Abnahme im Eiklar nicht eine entsprechende Zunahme im subembryonalen Kompartiment gegenübersteht. Den höchsten D-

Glucosegehalt wiesen die nichtgewendeten, intakten Eier auf, obgleich die D- Glucoseabnahme im Eiklar nicht größer war als bei den gewendeten, intakten Eiern. Dieser Befund zeigt, daß die Anreicherung von D- Glucose in der subembryonalen Flüssigkeit nicht den Ausstrom aus dem Eiklar wiedergibt. Ähnlich wie beim Transport von Flüssigkeit scheint sich auch das Wenden auf die Anreicherung von D- Glucose auszuwirken. Da bekannt ist, daß in der subembryonalen Flüssigkeit bzw. in der sie umgebenden Dottersackmembran D- Glucose umgesetzt wird, wurde der L- Laktatspiegel der subembryonalen Flüssigkeit untersucht.

Es zeigte sich, daß zwischen den beiden Gruppen der intakten Eier kein Unterschied im L- Laktatgehalt vorliegt (Abb. 9). Dies legt die Vermutung nahe, daß bei den gewendeten, intakten Eiern, ähnlich wie auch bei der Flüssigkeit, vermehrt D- Glucose aus dem subembryonalen Kompartiment abgegeben wird. Geht man davon aus, daß ein Unterlassen des Wendens eine Anreicherung von D- Glucose in der subembryonalen Flüssigkeit verursacht, so wäre dies auch bei den kultivierten Eiern, die ebenfalls nicht gewendet werden, erwartet worden. Im Vergleich zu den nichtgewendeten, intakten Eiern hatten die kultivierten Eier jedoch einen geringeren D- Glucosegehalt in der subembryonalen Flüssigkeit. Dieser überraschende Befund könnte damit erklärt werden, daß der Ausstrom von D- Glucose aus dem Eiklar durch die Kultivierung verzögert wird. Andererseits fällt bei den L- Laktatwerten auf, daß die vom Tag 0 an kultivierten Eier einen außerordentlich hohen L- Laktatspiegel aufwiesen. Dieser Anstieg ist offensichtlich nicht auf eine besonders ausgeprägte Hypoxie zurückzuführen, wie die Versuche mit unterschiedlichen Perforationszeitpunkten zeigen (Tab. 8). Offensichtlich wird vermehrt D- Glucose über die Glykolyse abgebaut, was jedoch im Vergleich mit der vorbebrüteten Gruppe nicht zu einer signifikanten Abnahme des D- Glucosespiegels in der subembryonalen Flüssigkeit führte. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß in dieser Entwicklungsphase bis zu 50% der vom Embryo aufgenommenen D- Glucose über den Pentosephosphatzyklus abgebaut wird (KUCERA 1984, TANIMURA

1970). Möglicherweise kommt der erhöhte L- Laktatspiegel durch eine Verschiebung des Pentosephosphatzyklus zugunsten der Glykolyse zustande.

Um letztendlich die Frage zu klären, wie sich das subembryonale Kompartiment bildet, wurden auch Versuche mit radioaktivem $^{42}\text{K}^+$ durchgeführt.

Die Befunde zeigen, daß zu Beginn des 3. Inkubationstages meßbare Mengen an $^{42}\text{K}^+$ in der subembryonalen Flüssigkeit vorhanden sind und die Anreicherung des Isotops deutlich zunimmt (Abb. 10a). Wurden diese Werte auf das zum jeweiligen Zeitpunkt gegebene Volumen der subembryonalen Flüssigkeit bezogen (Abb. 10b), so ergab sich ein nahezu linearer Anstieg. Dies deutet darauf hin, daß der Transport von $^{42}\text{K}^+$ mit dem Flüssigkeitsausstrom aus dem Eiklar einhergeht.

Darüberhinaus ging aus den Untersuchungen auch ein Einfluß des Wendens hervor. Nichtgewendete, intakte Eier hatten im Vergleich zu den gewendeten, intakten Eiern einen geringeren $^{42}\text{K}^+$ - Einstrom (Tab. 10). Dieser Effekt war nur am Tag 3 zu beobachten, jedoch nicht mehr am Tag 4. Die Ursache liegt möglicherweise darin, daß bei den nichtgewendeten, intakten Eiern von Tag 2 auf Tag 3 eine geringere Flüssigkeitsmenge aus dem Eiklar in das subembryonale Kompartiment einströmt, als in den gewendeten, intakten Eiern (Abb. 5).

Vergleicht man die Ergebnisse bezüglich des D- Glucose - und $^{42}\text{K}^+$ - Transports, so fällt auf, daß in der subembryonalen Flüssigkeit bei den nichtgewendeten, intakten Eiern die D- Glucosemenge höher liegt als bei den gewendeten, intakten Eiern (Abb. 8). Beim Transport von $^{42}\text{K}^+$ liegen jedoch umgekehrte Verhältnisse vor. Dies überrascht, da beide Substanzen mit der Flüssigkeit in das subembryonale Kompartiment transportiert werden. Diese widersprüchlichen Resultate könnten darauf zurückzuführen sein, daß mit D- Glucose eine Substanz gewählt wurde, die verstoffwechselt wird, was für $^{42}\text{K}^+$ nicht der Fall ist. D- Glucose wird einerseits im subembryonalen Bereich umgesetzt, andererseits auch für die Metabolisierung in den Embryo weitergeleitet. Dazu muß es ständig aus dem Eiklar nachgeliefert werden.

Allerdings wird auch $^{42}\text{K}^+$ aus der subembryonalen Flüssigkeit an den Embryo abgegeben, es wird jedoch nicht umgesetzt. Damit könnte $^{42}\text{K}^+$ zur Wiedergabe der Transportverhältnisse besser geeignet sein.

In diesem Zusammenhang muß bedacht werden, daß D- Glucose auch als Energiequelle für das Transportgeschehen dient. Der Befund, daß die Transportrate von $^{42}\text{K}^+$ unter dem Einfluß von Ouabain abnahm, spricht für die Existenz einer Na^+ - K^+ -ATPase (Tab. 9). Die Versuche ergaben jedoch keinen Hinweis, daß mit der Hemmung der ATPase der D- Glucosespiegel ansteigt. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, daß D- Glucose in erheblichem Umfang für Transportvorgänge verbraucht wird.

3. Embryonales Wachstum

Es ist aus einer Reihe von Untersuchungen bekannt (AUERBACH 1974, DUNN 1981, NARBAITZ et al. 1980, ROWLETT und SIMKISS 1986, ONO und WAKASUGI 1984), daß die Kultivierung das Wachstum der Embryonen verzögert. Um eine differenzierte Betrachtung embryonalen Wachstums zu ermöglichen, wurde der Verlauf des Feuchtgewichtes mit dem Verlauf des DNS- und Proteingehalts verglichen.

Dabei zeigte sich, daß die Embryonen gewendeter, intakter Eier im DNS- Gehalt und im Feuchtgewicht an den Tagen 7 und 8 größere Werte einnahmen als die Embryonen nichtgewendeter, intakter Eier. Jedoch lagen die Werte der Embryonen intakter Eier stets höher als die der kultivierten Embryonen. Zwischen den beiden Gruppen der kultivierten Embryonen bestanden keine Abweichungen.

Es stellte sich die Frage, ob die im vorherigen Abschnitt aufgezählten Unterschiede in den Parametern eine Entwicklungsverzögerung darstellen oder ob sogar qualitative Veränderungen im vorgegebenen Entwicklungsprozeß vorliegen. Um diese Frage zu klären, wurde untersucht, ob die Werte der Parameter in allen Gruppen einer Gleichung folgen, die RICKLEFS (1987) für die Beschreibung des Wachstums beim Hühnerembryo eingesetzt hat. Wie die Abbildungen 11 bis 13 zeigen, war es möglich die Gleichung an die Meßwerte anzupassen und die dazugehörigen Kurven darzustellen.

Daraus geht hervor, daß die natürlich vorgegebene Gesetzmäßigkeit der Zunahme in allen drei Parametern bei allen Gruppen erhalten geblieben ist. In den einzelnen Gruppen kommt es lediglich zu einer Verzögerung in der Ausbildung der drei Wachstumsparameter, was aus dem Vergleich gleichaltriger Embryonen ersichtlich ist.

In dieser Gleichung stellt b die Richtung und Geschwindigkeit der Zunahme des jeweiligen Parameters in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dar.

Wenn die Werte für die Konstante b in den einzelnen Gruppen miteinander verglichen werden, so fällt auf, daß die Konstanten in den einzelnen Gruppen beim Feuchtgewicht, aber nicht

im DNS- und Proteingehalt verschieden voneinander waren. Die kultivierten Embryonen wiesen die niedrigeren Werte für die Konstante b auf.

An dieser geringeren Geschwindigkeit in der Zunahme des Feuchtgewichts ist mit Sicherheit der DNS- und Proteingehalt nicht beteiligt. Dies kann aufgrund der annähernd gleichen Werte für die Konstante b ausgeschlossen werden. Da der Embryo zu diesem Zeitpunkt keine größeren Fett- und Kohlenhydratreserven anlegt, kommen diese Substanzen für die Veränderung in der Entwicklung des Feuchtgewichtes ebenfalls nicht in Frage. Somit bleibt als entscheidende Größe der Wassergehalt übrig.

Die Vorstellung, daß die unterschiedliche Geschwindigkeit in der Feuchtgewichtszunahme durch den Flüssigkeitsgehalt der Embryonen bedingt ist, wird noch dadurch unterstützt, daß auch bei der Ausbildung der subembryonalen Flüssigkeit ein deutlicher Unterschied zwischen kultivierten und intakten Eiern gegeben war. Der verzögerte Flüssigkeitsausstrom aus dem Eiklar in kultivierten Eiern könnte sich auf diese Weise im embryonalen Feuchtgewicht manifestieren.

Der Befund, daß sich die DNS- Werte gleichaltriger Embryonen intakter und kultivierter Eier unterscheiden, führte zu Untersuchungen, in denen die DNS- Synthese mit $[^3\text{-H}]\text{dT}$ bestimmt wurde.

Aus dem Einbau von $[^3\text{-H}]\text{dT}$ in die DNS (Abb. 14) war zu ersehen, daß die Markierung der DNS in allen Gruppen zwischen Tag 3 und Tag 8 abnahm. Im Vergleich zwischen den Gruppen lagen die Einbauraten der Embryonen der kultivierten Gruppen i.d.R. höher als die Embryonen intakter Eier.

Die DNS- Synthese nimmt offensichtlich mit fortschreitender Entwicklung ab. Darauf weisen auch Untersuchungen von FRIEDKIN (1955) hin. Zudem zeigte BAST (1987), daß mit L-Thyroxin, das den Entwicklungsprozeß beschleunigt, in verschiedenen Organen ein vorzeitiger Abfall der $[^3\text{-H}]\text{dT}$ -Einbaurate erreicht werden kann.

Die höheren Einbauraten könnten somit darauf hindeuten, daß die kultivierten Embryonen zum jeweiligen Zeitpunkt einen

geringeren Entwicklungsgrad erreicht haben.

In diesem Zusammenhang ist jedoch zu bedenken, daß der erhöhte Einbau von [$^3\text{-H}$]dT z.T. von der höheren Anflutung der radioaktiven Vorstufe in den kultivierten Embryonen verursacht wird (Abb. 15). Wurde diese Einflußgröße berücksichtigt und der [$^3\text{-H}$]dT- Einbau in die DNS als prozentualer Anteil der Anflutung berechnet (Abb. 16), so ergibt sich, daß die DNS- Synthese in den kultivierten Embryonen offenbar verzögert ist. Im dargestellten Untersuchungszeitraum erreichen die Embryonen intakter Eier anscheinend relativ früh einen Höchstwert, den die kultivierten Embryonen zu einem späteren Zeitpunkt einnehmen, wenn die Synthese in den Embryonen intakter Eier bereits wieder abfällt.

Dies bestätigt auch auf der Basis des DNS-Stoffwechsels einen verzögerten Entwicklungsverlauf der kultivierten Embryonen. Weiterhin wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Werte im Proteingehalt zwischen kultivierten Embryonen und Embryonen intakter Eier auf Unterschiede in der Proteinsynthese zurückzuführen sind. Dazu wurde L- [$\text{U-}^{14}\text{C}$]- Glutaminsäure als radioaktive Vorstufe eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied (Tab. 11). Offensichtlich weicht der Ablauf der Proteinsynthese in den kultivierten Embryonen nicht von dem der Embryonen intakter Eier ab. Dies führte zu der Überlegung, ob möglicherweise das Angebot an freien Aminosäuren, das dem Embryo zur Verfügung steht, den Unterschied verursacht. Diese freien Aminosäuren stammen von den Dotterproteinen und werden durch Proteasentätigkeit in der subembryonalen Flüssigkeit bereitgestellt. Die Werte der einzelnen Aminosäuren zeigten am Tag 3 keine Unterschiede zwischen den Gruppen, wohingegen am Tag 6 nahezu alle Aminosäuren bei den intakten Eiern höhere Werte aufwiesen als die kultivierten Eier. Dies deckt sich mit den Befunden beim Proteingehalt, wonach am Tag 3 im Gegensatz zu Tag 6 kein Unterschied zwischen den Embryonen intakter Eier und den kultivierten Embryonen vorhanden war. Die Unterschiede im Proteingehalt könnten somit auf ein unterschiedliches Angebot an zur Verfügung stehenden Aminosäuren zurückzuführen sein.

4. Ausscheidung von Harnsäure, Nukleosiden und seltenen Nukleosiden in die Allantoisflüssigkeit

Die Auswirkungen der Kultivierung und des Wendens wurden auch am Verhalten verschiedener Ausscheidungsprodukte verfolgt. Die gewählten Parameter, die den Protein- und Nukleinsäurenstoffwechsel widerspiegeln, zeigten bei den kultivierten Embryonen eine Tendenz zu einer verringerten Ausscheidung. Mit Ausnahme der Harnsäure und der methylierten Nukleoside waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den Embryonen intakter Eier vorhanden.

Dies war bei der Harnsäure und z.T. bei den methylierten Nukleosiden auch dann der Fall, wenn zusätzlich zur Gesamtausscheidung auch die Konzentration berechnet wurde.

In der Harnsäureausscheidung kommt sowohl der Nukleinsäuren- wie auch der Proteinstoffwechsel zum Ausdruck. Da sich die kultivierten Embryonen von den gleichaltrigen Embryonen intakter Eier hinsichtlich ihres DNS- und Proteingehalts unterschieden, könnte dieser Befund die unterschiedliche Harnsäureausscheidung erklären.

In der Harnsäureausscheidung wird zudem ein Effekt des Wendens sichtbar. Die Embryonen nichtgewendeter, intakter Eier weisen weniger Harnsäure in der Allantois auf als die Embryonen gewendeter, intakter Eier. Da in dieser Gruppe lediglich der DNS- Gehalt, aber nicht der Proteingehalt beeinträchtigt war, bleibt offen, wodurch dieser Effekt zustandekommt.

Die Ausscheidung methylierter Purinnukleoside nahm in der Gruppe der gewendeten, intakten Eier gegenüber den kultivierten deutlich zu. Nachdem diese "seltenen" Nukleoside in erster Linie in der t- RNS vorkommen (LÜPKE und SEELA 1978) und unverändert in den Urin gelangen, könnte eine erhöhte Ausscheidung dieser Produkte auch auf einen erhöhten t- RNS-Umsatz zurückgeführt werden (BOREK 1984). Diese Ausscheidung methylierter Produkte vergrößert sich offensichtlich mit fortschreitender Entwicklung (Abb. 19). Möglicherweise deuten auch diese Parameter auf eine durch die Kultivierung bzw. das Unterlassen des Wendens bedingte Entwicklungsverzögerung hin.

V. Zusammenfassung

Die Entwicklung des Embryos der Japanischen Wachtel unter in vitro-Bedingungen

In der vorgestellten Arbeit wurde ein System entwickelt, in dem die Kultivierung des Embryos der Japanischen Wachtel vom Beginn der Bebrütung an durchgeführt werden kann.

Dies ist dann möglich, wenn das Austrocknen der Keimscheibe durch eine Folie mit geringer Gasdurchlässigkeit verhindert wird.

Um den Einfluß der Kultivierung auf die Entwicklung zu untersuchen, wurden vier verschiedene Gruppen eingesetzt:

- a) intakte Eier, die unter normalen Bedingungen bebrütet wurden.
- b) intakte Eier, die ohne zu wenden bebrütet wurden. Diese Gruppe wurde miteinbezogen, weil Wenden in den kultivierten Eiern nicht möglich ist.
- c) Eier, die nach zweitägiger Bebrütung kultiviert wurden.
- d) Eier, die zum Zeitpunkt 0 kultiviert wurden.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß das Unterlassen des Wendens zu Störungen im Flüssigkeits- und Glucosetransport aus dem Eiklar und der subembryonalen Flüssigkeit führt. Zudem werden Harnsäure und methylierte Nukleoside in in geringerem Umfang in die Allantois ausgeschieden. Ähnliche Auswirkungen hatte auch der Kultivierungsprozess.

In Bezug auf die Wachstumparameter hatte ein Unterlassen des Wendens ein geringeres Feuchtgewicht und einen geringeren DNS-Gehalt zur Folge. Bei den kultivierten Embryonen war darüberhinaus auch noch ein geringerer Proteingehalt zu beobachten.

Das Unterlassen des Wendens und die Kultivierung scheinen hauptsächlich eine Wachstumsretardierung zu bewirken und keine qualitativen Störungen der Entwicklung. Darauf weist der parabolische Verlauf der Kurven der Wachstumparameter hin, die über eine mathematische Gleichung durch Anpassung an die experimentellen Daten erhalten wurden.

Mit diesen Ergebnissen stimmt zudem überein, daß der Einbau von [$^3\text{-H}$]dT und die Proteinsynthese bei den Embryonen kultivierter Eier im Vergleich mit den Embryonen intakter Eier verzögert sind.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß die Entwicklung der kultivierten Embryonen zum einen durch fehlendes Wenden, zum andern durch die Kultivierung selbst beeinträchtigt wird.

Schließlich führt die Kultivierung zum Zeitpunkt 0 verglichen mit den nach Vorbebrütung kultivierten Eiern zu einem signifikanten Anstieg im L- Laktatgehalt der subembryonalen Flüssigkeit. Dabei ist interessant, daß sich unter diesen Bedingungen die spontane Mißbildungsrate erhöhte.

Summary

The embryonic development of the Japanese Quail under in vitro conditions

In the work presented here a culture system was developed which allows the cultivation of the quail embryo from the very beginning of incubation. This is possible if drying out of the blastoderm is prevented by covering the culture vessel with a foil of a very low gas exchange capacity.

In order to study the influence of culturing on development four different groups were used:

- a) intact eggs were incubated under normal conditions.
- b) intact eggs were incubated without turning. This was done, because turning in cultured eggs is not possible.
- c) eggs were cultivated after 2 days of preincubation.
- d) eggs were cultivated from the very beginning of incubation.

The results reveal that failure of turning leads to disturbances of the liquid- and glucosetransport out of the albumen and the subembryonic liquid. Furthermore a decrease in uric acid and methylated nucleosides in the allantoic fluid was observed.

Similar effects are caused by the culture process itself.

As to the growth parameters a lower wet weight and DNA content were observed when turning was omitted. Removing the egg shell leads to a lower wet weight, DNA- and protein content.

The effects of nonturning and culturing on those parameters seems mainly to be due to a retardation rather than to qualitative disturbances of development. This conclusion may be drawn from the curves of the growth parameters, which were obtained by fitting a mathematical equation to the experimental data.

In accordance with this is the finding that in cultured embryos the [$^3\text{-H}$]dT uptake and the protein synthesis was delayed compared with intact eggs.

On the basis of these results the developmental process of

cultured embryos seems to be affected by the failure of turning and by the culture procedure itself.

Finally, cultivating from the very beginning of incubation on leads to a significant increase in the subembryonic lactate content compared to embryos cultivated from day 2 on. Interestingly, malformations were enhanced under those conditions.

VI. Literaturverzeichnis

- Ar, A. and H. Rahn, 1980**
Water in the avian egg: overall budget of incubation.
Am. Zool. 20, 373-384
- Auerbach, R., L. Kubai, Knighton, D. and J. Folkman, 1974**
A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos.
Dev. Biol. 41, 391-394
- Ausprunk, D.H., D.R. Knighton and J. Folkman, 1975**
Vascularisation of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois.
Role of host and preexisting graft blood vessels.
Am. J. Path. 79(3), 597-610
- Austic, R.E. and C.R. Grau, 1971**
Degeneration of the eyes and central nervous system of chick embryos subjected to phenylalanine and tyrosine deficiency.
Dev. Biol. 25, 159-175
- Austic, R.E., C.R. Grau and G.C. Matteson, 1966**
Requirements for glucose and amino acids in defined media for chick embryos.
J. Nutr. 90, 175-182
- Barnett, S.B., 1981**
A method for the observation of long-term development in chick embryo.
Poult. Sci. 61, 172-174
- Bast, J-P., 1987**
Der Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf die DNA-Synthese beim Hühnerembryo
Med. vet. Diss., München
- Bellairs, R., 1964**
Biological aspects of the yolk of the hen's egg.
In: Advances in Morphogenesis, 4, pp.217 Academic Press, New York and London
- Bergmeyer, H.U., E. Bernt, F. Schmidt und H. Stork, 1970**
In: Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg. H. U. Bergmeyer), S. 1163-1172, Verlag Chemie, Weinheim

- Bloomfield, R.A., A.A. Letter and R.P. Wilson, 1969**
The effect of glycine on ammonia intoxication and uric acid biosynthesis in the avian species.
Arch. Biochem. Biophys. 129, 196-201
- Boone, M.A., 1963**
A method of growing chick embryos in vitro.
Poult. Sci. 42, 916-921
- Borek, E., O.K. Sharma and T.P. Waalkes, 1983**
New applications of urinary nucleoside markers.
Recent results in cancer research, 84, 301-316
- Brown, P.R., 1983**
Current high-performance liquid chromatographic methodology in analysis of nucleotides, nucleosides and their bases. I
Canc. Invest. 1(5), 439-454
- Brown, P.R., 1983**
Current high-performance liquid chromatographic methodology in analysis of nucleotides, nucleosides and their bases. II
Canc. Invest. 1(6), 527-536
- Burke, B., R. Marbaitz and S. Tolnai, 1979**
Abnormal characteristics of the blood from chick embryos maintained in shell-less culture.
Rev. Can. Biol. 38(2), 63-66
- Burton, K., 1955**
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 62, 315-322
- Calderera, C.M. and G. Moruzzi, 1965**
Polyamines and nucleic acids during development of the chick embryo.
Biochem. J. 97, 709-722
- Chaube, S., 1962**
Hypoxanthine dehydrogenase in the developing chick embryonic kidney
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 340-342

- Corner, M.A. and A.Ph.J. Richter, 1973**
 Extended survival of the chick embryo in vitro.
Experientia 29(4), 467-468
- Crooks, J.R. and K. Simkiss, 1974**
 Respiratory acidosis and eggshell resorption by the chick embryo.
Exp. Biol. 61, 197-202
- Cunningham, F.E., 1974**
 Changes in egg white during incubation of the fertile egg.
Poult. Sci. 53, 1561-1565
- Davis, A.Th. and R.A. Ackerman, 1987**
 Effects of increased water loss on growth and water content of the chick embryo.
Exp. Zool. Suppl. 1, 357-364
- Davis, G.E., R. Suits, K.C. Kuo, C.W. Gehrke, T.P. Waalkes, and E. Borek, 1977**
 High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of nucleosides in urine and some other biological fluids.
Clin. Chem. 23/8, 1427-1435
- Deeming, D.C., K. Rowlett and K. Simkiss, 1987**
 Physical influences on embryo development.
J. Exp. Zool. Suppl. 1, 341-347
- De Gennaro, L.D., D.S. Packard, R.W. Stach and B.J. Wagner, 1980**
 Growth and differentiation of chicken embryos in simplified shell-less cultures under ordinary conditions of incubation.
Growth 44, 343-354
- Dewar, W.A., P.W. Teague and J.N. Downie, 1974**
 The transfer of minerals from the egg to the chick embryo from the 5th to 18th days of incubation.
Br. Poult. Sci. 15, 119-129
- Dunn, B.E., 1974**
 Technique for shell-less culture of the 72-hour avian embryo.
Poult. Sci. 53, 409-412

- Dunn, B.E. and M.A. Boone, 1976**
Growth of the chick embryo in vitro.
Poult. Sci. 55(1), 1067-1071
- Dunn, B.E. and M.A. Boone, 1977**
Growth and mineral content of cultured chick embryos.
Poult. Sci. 56, 662-672
- Dunn, B.E. and M.A. Boone, 1978**
Photographic study of chick embryo development in vitro.
Poult. Sci. 57, 370-377
- Dunn, B.E. and T.P. Fitzharris, 1979**
Differentiation of the chorionic epithelium of chick embryos maintained in shell-less culture.
Dev. Biol. 71, 216-227
- Dunn, B.E., T.P. Fitzharris and B.D. Barnett, 1981**
Effects of varying chamber construction and embryo pre-incubation age on survival and growth of chick embryos in shell-less culture.
Anat. Rec. 199, 33-43
- Elliot, J.H. and J. Bennet, 1971**
Growth of chick embryos in polyethylene bags.
Poult. Sci. 50, 974-975
- Emanuelsson, H., 1954**
Variations in nucleic acid concentration during the development of early chick embryo.
Acta Physiol. Scand. 44, 336-364
- Flickinger, R.A., 1957**
Amino acid studies in relation to yolk utilization in the chick embryo.
Experientia 13, 248
- Fraser, R.C., 1957**
Somite genesis in the chick
I. Partial characterisation of stimulatory factors in egg white.
Growth 21, 29-43
- Fraser, R.C., 1959**
Somite genesis in the chick
II. Analysis of nutrients from yolk
Biol. Bull. 116, 420-428

Fraser, R.C., 1960a

Somite genesis in the chick
III. The role of induction
J. Exp. Zool. 145, 151-163

Fraser, R.C., 1960b

Somite genesis in the chick
IV. Activity of sulfur-containing compounds
J. Exp. Zool. 145, 169-178

Freeman, B.M. and M.A. Vince, 1974

Development of the avian embryo.
Chapman and Hall, London

Friedkin, M., D. Tilson and D. Roberts, 1955

Studies of deoxyribonucleic acid biosynthesis in
embryonic tissues with thymidine-C¹⁴.
J. Biol. Chem. 220, 627-637

Garcia, P.J., A. Pons, M. Alemany and A. Palou, 1983

Permeability of chicken egg vitelline membrane to
glucose, carbohydrate gradients between albumen and
yolk.
Comp. Biochem. Physiol. 75B, 137-140

Gehrke, C.W., K.C. Kuo, G.E. Davis and R.D. Suits, 1978

Quantitative high-performance liquid chromatography of
nucleosides in biological materials.
J. Chrom. 150, 455-476

**Gehrke, C.W., R.A. Mac Cune, M.A. Gama-Sosa, M. Ehrlich and
K.C. Kuo, 1984**

Quantitative reversed-phase high-performance liquid
chromatography of major and modified nucleosides.
J. Chrom. 301, 199-219

Goette, A., 1982

Einfluß einiger radioprotektiver und radiosensibili-
sierender Verbindungen auf die semikonservative und
reparaturbedingte DNA-Synthese von Rattenmilzzellen in
vitro.
Med. vet. Diss., München

Grabowski, C.T., 1966

Teratogenic effects of calcium salts on chick embryos.
J. Embryol. Exp. Morphol. 15(2), 113-118

- Graham, D.L. and G.W. Meier, 1975**
Standards of morphological development of the quail,
Coturnix coturnix japonica, embryo.
Growth 39, 389-400
- Grau, C.R., N.E. Walker, H.J. Frits, and S.M. Peters, 1963**
Successful development of chick embryos nourished by
yolk sac perfusion with calcium-low media.
Nature 197, 257-259
- Grau, C.R., R.E. Austic and G.C. Matteson, 1965a**
Degeneration of the eyes of tyrosine-deficient chick
embryos.
Sci. 148, 1743-1745
- Grau, C.R., 1968**
Avian embryo nutrition.
Fed. Proc. 27, 185-192
- Guidotti, G.G., L. Loreti, G. Gaja, and P.P. Foa,**
Glucose uptake in the developing chick embryo heart.
Am. J. Physiol. 211, 981-987
- Hagemeier, E., K. Kemper, K.S. Boos, and E. Schlimme, 1984**
Development of a chromatographic method for the quanti-
tative determination of minor ribonucleosides in
physiological fluids.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 175-184
- Hahn, H.P.V. and H. Herrmann, 1962**
Effects of amino acid analogues on growth and catheptic
activity of chick embryo explants.
Dev. Biol. 5, 309-327
- Hamburger, V. and H. Hamilton, 1951**
A series of normal stages in the development of the
chick embryo.
J. Morphol. 88, 49-92
- Hartwick, R.A., A.M. Krstulowic, and P.R. Brown, 1979**
Identification and quantitation of nucleosides , bases
and other uv-absorbing compounds in serum, using
reversed-phase high-performance liquid chromatography.
J. Chrom. 186, 659-676

Hazelwood, R.L., 1965

Carbohydrate Metabolism.

In: Avian Physiology (P.D. Sturkie Ed.), pp. 313-371,
Cornell University Press, Ithaca/New York**Herrmann, H. and P.W. Schultz, 1958**Incorporation of glycine into the proteins of explanted
chick embryos.Arch. Biochem. Biophys. 73, 296-305**Bohorst, H.J., 1970**In: Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg. H.U.
Bergmeyer), S. 1425-1429, Verlag Chemie, Weinheim**Holdsworth, C.D. and T.H. Wilson, 1967**Development of active sugar and amino acid transport in
the yolk sac and intestine of the chicken.Am. J. Physiol. 212(2), 233-240**Howard, E., 1953**Some effects of NaCl Concentration on the development of
early chick blastoderms in culture.J. Cell. Comp. Physiol. 41, 237-259**Howard, E., 1957**Ontogenetic changes in the freezing point and sodium and
potassium content of the subgerminal fluid and blood
plasma of the chick embryo.J. Cell. Comp. Physiol., 50, 451-470**Hughes, A.F., Freeman, R.B. and T. Fadem, 1974**

The teratogenic effects of sugars on the chick embryo.

J. Embryol. Exp. Morphol. 32(3), 661-674**Johnston, P.M. and C.L. Colmar, 1955**Distribution and contribution of calcium from the
albumen, yolk and shell to the developing chick embryo.Am. J. Physiol. 183, 365-370**Klein, N.W., E. McConnell and B.J. Buckingham, 1962**Growth of explanted chick embryos on a chemically
defined medium and effects of specific amino acid
deficiencies.Dev. Biol. 5, 296-308

Kochav, S., M. Ginsburg and H. Eyal-Giladi, 1980

From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick

II. Microscopic anatomy and cell population dynamics
Dev. Biol. 79, 296-308

Krstulovic, A.M., P.R. Brown and D.M. Rosle, 1977

Identification of nucleosides and bases in serum and plasma samples by reverse-phase high performance liquid chromatography.

Anal. Chem. 49, 14, 2237-2241

Künzel, E., 1962

Die Entwicklung des Hühnchens im Ei.

Paul Parey Verlag, Hamburg.

Kutchai, E. and J.B. Steen, 1971

Permeability of the shell and shell membranes of hens' eggs during development.

Resp. Physiol. 11, 265-268

Lomholt, J.P., 1976

The development of the oxygen permeability of the avian egg shell and its membranes during incubation.

J. Exp. Zool. 198, 177-184

Lüpke, U. und F. Seela, 1978

Seltene Nucleoside.

Chemie in unserer Zeit 12, 189-198

Mac Indoe, W.M., 1960

Changes in the protein content of yolk during chick embryogenesis.

J. Embryol. Exp. Morphol. 8(1), 47-53

Marks, H.L., 1975

Relationship of embryonic development to egg weight, hatch weight and growth in Japanese quail.

Poult. Sci. 54, 1257-1262

Maurer, H.R., 1981

Potential pitfalls of (³H)thymidine techniques to measure cell proliferation.

Cell Tissue Kinet. 14, 111-120

- Meuer, H.J. and R. Baumann, 1987**
Oxygen supply of early chick embryo in normoxia and hypoxia.
J. Exp. Zool. Suppl. 1, 203-209
- Nass, G., 1985**
Ausscheidung von Nucleinsäuremetaboliten als Krebstest.
Naturwiss. Rundsch. 39(2), 67-70
- Narbaitz, R. and S.S. Jande, 1978**
Ultrastructural observations on the chorionic epithelium, parathyroid glands and bones from chick embryos developed in shell-less culture.
J. Embryol. Exp. Morphol. 45, 1-12
- Narbaitz, R. and S. Kacew, 1978**
Ultrastructural and biochemical observations on the metanephros of normal and cultured chick embryos.
Anat. Embryol. 155, 95-105
- Narbaitz, R., 1979**
Response of shell-less cultured chick embryos to exogenous parathyroid hormone and 1,25-Dihydroxycholecalciferol.
Gen. Comp. Endocrinol. 37, 440-442
- Narbaitz, R., Kacew, S. and B. Burke, 1980**
Ultrastructural and biochemical alterations in the livers from chick embryos maintained in shell-less culture.
Anat. Embryol. 159, 307-316
- New, D.A.T., 1955**
A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro.
J. Embryol. Exp. Morphol. 3(4), 320-331
- New, D.A.T., 1956**
The formation of subblastodermic fluid in hens' eggs.
J. Embryol. Exp. Morphol. 4/3, 221-227
- New, D.A.T., 1959**
The adhesive properties and expansion of the chick blastoderm.
J. Embryol. Exp. Morphol. 7/2, 147-164

New, D.A.T., 1966

The chick.

In: The culture of vertebrate embryos, pp. 47-98,
Academic Press, London

Olszanska, B. and Z. Lassota, 1980

Simple in vitro system for molecular studies of early
avian development in the quail.

Br. Poult. Sci. 21, 395-403

Ono, T. and N. Wakasugi, 1982

Development of cultured quail embryo.

Poult. Sci. 61, 532-536

Ono, T. and N. Wakasugi, 1984

Mineral content of quail embryos cultured in mineral-
rich and mineral-free conditions.

Poult. Sci. 63, 159-166

Padgett-Smith, C. and W.D. Ivey, 1960

The normal embryology of the coturnix quail.

Anat. Rec. 137, 1-11

Palén, K. and C. Thörneby, 1976

A simple method for cultivating the early chick embryo
in vitro.

Experientia 32(2), 267-268

Perry, M.M., 1988

A complete culture system for the chick embryo.

Nature, 331, 70-72

Pfadenhauer, E.H. and S.-D. Tong, 1979

Determination of inosine and adenosine in human plasma
using high-performance liquid chromatography and a
boronate affinity gel.

J. Chrom. 162, 585-590

Quisenberry, J.H. and E.J. Dillon, 1962

Growing embryos in plastic shells.

Poult. Sci. 41, 1675

Reichard, P., 1978

From deoxynucleotides to DNA synthesis.

Federation Proceedings 37.1, 9-14

Ricklefs, R.E., 1987

Comparative analysis of avian embryonic growth.
J. Exp. Zool. Suppl. 1, 309-325

Romanoff, A.L., 1967

Biochemistry of the avian embryo.
John Wiley & Sons, New York.

Rowlett, K. and K. Sinkiss, 1987

Explanted embryo culture: in vitro and in ovo techniques
for domestic fowl.
Br. Poult. Sci. 28, 91-101

Rupe, C.O. and C.J. Farmer, 1955

Amino acid studies in the transformation of proteins of
the hen's egg to tissue proteins during incubation.
J. Biol. Chem. 213, 899-906

Sachs, L., 1982

Applied statistics. A handbook of techniques.
Translated by Z. Reynarowych.
Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

Scholander, P.F. and G.A. Edwards, 1942

Micro respiration apparatus.
Rev. Sci. Instruments 13, 292-295

Schultz, P.W. and H. Herrmann, 1958

Effect of a leucine analogue on incorporation of glycine
into the proteins of explanted chick embryos.
J. Embryol. Exp. Morphol. 6(2), 262-269

Seymour, R.S. and J. Piiper, 1988

Aeration of the shell membranes of avian eggs.
Resp. Physiol. 71, 101-116

Silver, P.H.S., 1960

Special problems of experimenting in ovo on the early
chick embryo and a solution.
J. Embryol. Exp. Morphol. 8(4), 369-375

Sinkiss, K., 1961

Calcium metabolism and avian reproduction.
Biol. Rev. 36, 321-367

Sinkiss, K., 1980a

Water and ionic fluxes inside the egg.
Am. Zool. 20, 405-416

Sinkiss, K., 1980b

Eggshell porosity and the water metabolism of the chick embryo.
J. Zool.(London), 192, 1-8

Slavkin, H.C., M. D. Slavkin and P. Bringas jr., 1980

Mineralisation during long-term cultivation of chick embryos in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 163, 249-257

Solomon, J.B., 1957

Nucleic acid content of the egg of the domestic fowl.
Biochim. Biophys. Acta 23, 211-213

Solomon, J.B., 1957

Synthesis of nucleic acids by chick blastoderms grown on synthetic medium.
Biochim. Biophys. Acta 25, 69-73

Spratt, M.T. jr., 1946/47

Development in vitro of the early chick blastoderm explanted on yolk and albumen extract saline-agar substrata.
J. Exp. Zool. 106/107, 345-365

Spratt, M.T., 1947

A simple method for explanting and cultivating early chick embryos in vitro.
Sci. 106, 452

Spratt, M.T. jr., 1955

Analysis of the organizer center in the early chick embryo.
J. Exp. Zool. 128, 121-163

Spratt, M.T. jr. and H. Haas, 1960

Morphogenetic movements in the lower surface of the unincubated and early chick blastoderm.
J. Exp. Zool. 143/144,

SPSS Inc., Norusis, M.J., 1986

SPSS/PC for the IBM PC/XT/AT. SPSS Inc., Chicago

- Steen, J.B., 1971**
Gas exchange of the bird egg.
In: Comparative physiology of respiration mechanisms,
pp. 147-154, Academic Press, London and New York.
- Taussig, M.P., 1965**
Incorporation of amino acids into chick proteins during
embryonic growth.
Can. J. Biochem. 43, 1099-1110
- Tazawa, H., 1980**
Adverse effect of failure to turn the avian egg on the
embryo oxygen exchange.
Respir. Physiol. 41, 137-142
- Terepka, A.R., M. E. Stewart and W. Merkel, 1969**
Transport functions of the chick chorio-allantoic
membrane: II. Active calcium transport in vitro.
Exp. Cell Res. 58, 107-117
- Tuan, R.S., 1980**
Calcium transport and related functions in the chorio-
allantoic membrane of cultured shell-less chick embryo.
Dev. Biol. 74, 196-204
- Tuan, R.S., 1983**
Supplemental eggshell restores calcium transport in
chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick
embryo.
J. Embryol. Exp. Morphol. 74, 119-131
- Tuft, P. and A. Jurand, 1961**
Distribution of water in the chick blastoderm.
Nature 191, 1073-1074
- Tullet, S.G. and R.G. Board, 1976**
Oxygen flux across the integument of the avian egg
during incubation.
Br. Poult. Sci. 17, 441-450
- Vleck, C.M., D. Vleck and D.F. Hoyt, 1980**
Patterns of metabolism and growth in avian embryos.
Am. Zool. 20, 385-393
- Waddington, C.H., 1934**
Experiments on embryonic induction.
J. Exp. Biol. 11(3), 211-227

Walker, N.E. and C.R. Grau, 1963

Growth and development of chick embryos supplied with various concentrations of yolk.

J. Nutr. 79, 205-210

Widnell, C.C. and J.R. Tata, 1964

A procedure for the isolation of enzymatically active rat-liver nuclei.

Biochem. J. 92, 313-317

Williams, J., 1967

Yolk utilization in birds.

In: The biochemistry of animal development, Vol. II Biochemical control mechanisms and adaptations in development, pp.356-372, Academic Press, London and New York

Williams, M.A., W. A. Da Costa, L. H. Newman and L.H. Marshall, 1954

Free amino acids in the yolk during the development of the chick.

Nature 173, 490

Yager, J.D and M.W. Klein, 1974

Protein nitrogen and DNA accumulation in early chick embryos cultured on several purified yolk proteins.

Dev. Biol. 39, 105-115

Young, M.F., P.P. Minghetti and M.W. Klein, 1980

Yolk sac endoderm: exclusive site of serum protein synthesis in the early chick embryo.

Dev. Biology 75, 239-245

Ganz besonders herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Wittmann für die Überlassung des Themas, die stets gewährte Unterstützung und die vielen Anregungen, die zum Gelingen beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Zucker und Herrn Prof. Dr. Merckenschlager möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die angenehmen Arbeitsbedingungen im Institut danken.

Bei Herrn Dr. W. Kugler bedanke ich mich für die wertvolle Vorarbeit, die er zu diesem Thema geleistet und die er bereitwillig zur Verfügung gestellt hat.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frl. Sabine Katzschmann, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Allen Doktoranden des Labors 122 und Frau B. Hofer danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Kollegen Herrn Dr. F. Schweigert, Herrn Dr. M. Stohrer, Frau Dr. C. Flurer und Frl. Dr. B. Kohn danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die stets gewährte Unterstützung.

Frau Dr. Holstein danke ich für die Aminosäurenanalysen.

Lebenslauf

1. 7. 1959	geboren in Dachau als Sohn des Werkzeug- machers Emil Kaltner und der Hausfrau Anita Kaltner geb. Kobold
1965 - 1969	Grundschule in Dachau
1969 - 1978	Mathematisch - Naturwissenschaftliches Gymnasium in Dachau
29. 6. 1978	Abitur
1978 - 1979	Grundwehrdienst in Mittenwald
1979 - 1985	Studium der Tiermedizin an der Ludwigs- Maximilians Universität München
7. 2. 1985	Staatsexamen
seit April 1985	Anfertigung einer Dissertation am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
13. 5. 1985	Approbation
Mai 1985 - Oktober 1986	freier Mitarbeiter in der Großtierpraxis Dr. Hugo Wagner, Wolnzach/Obb.
November 1985 - April 1986	teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft in obigem Institut
seit November 1986	wissenschaftlicher Angestellter

